

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN
DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS DE TIPO
POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Por

L.B.G. RAUL ENRIQUE MARTÍNEZ HERRERA

Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Enero, 2021

**ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN
DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS DE TIPO
POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)**

Comité de Tesis

	Dra. Maria Elizabeth Alemán Huerta Presidente
	Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde Secretario
	Dra. Susana de la Torre Zavala Vocal
	Dra. Verónica Almaguer Cantú Vocal
	Dra. Isela Quintero Zapata Vocal

**ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN
DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS DE TIPO
POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)**

Dirección de Tesis



Dra. María Elizabeth Alemán Huerta
Director



Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por el apoyo brindado a manera de beca nacional (beca número 468278) y al apoyo económico aportado por el proyecto PAICYT CN905-19 con el cual fue posible suministrar material y reactivos.

Agradecimiento especial a la Dra. María Elizabeth Alemán Huerta por dirigir este proyecto y el apoyo brindado durante toda mi carrera profesional. También a la Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde por el apoyo técnico, a la Dra. Verónica Almaguer Cantú por el espacio brindado en el Laboratorio 10 del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León y su intervención para el uso de equipos, materiales y reactivos. Asimismo, se agradece a la Dra. Isela Quintero Zapata por el apoyo técnico y económico brindado, a la Dra. Lucia Palacios Cortez por la ayuda aportada en cuanto al uso técnico del biorreactor y a la Dra. Susana de la Torre Zavala por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto.

Igualmente, se le agradece al personal del Instituto Tecnológico de Durango, Tecnológico Nacional de México; especialmente a la Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones por su trascendental ayuda moral, técnica y analítica brindada. También, al Dr. Walfred Rosas Flores por los conocimientos aportados en cuanto al manejo técnico del DSC y al Dr. Víctor J. Martínez por su ayuda en el manejo técnico del XRD. Además, un agradecimiento especial al Dr. Hiram Medrano Roldán por el espacio brindado en el laboratorio de Innovación Tecnológica en Alimentos y Biotecnología Industrial en dicha institución. Asimismo, se agradece al personal del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Durango; especialmente al Dr. Ignacio Villanueva Fierro y a la Dra. Paola Flores Rodríguez por su invaluable ayuda en cuanto al uso del microscopio confocal y el análisis de resultados y al Dr. Gildardo Rivera, investigador del Centro de Biotecnología Genómica (CBG-IPN) Unidad Reynosa por su apoyo con los análisis de ^1H -RMN.

Por último, se agradece al Ing. Eduardo Falcón Dávila y al Ing. Roberto A. Urdiales Salinas por su importante ayuda en cuanto a las reparaciones técnicas del biorreactor utilizado en este proyecto.

DEDICATORIAS

Al Señor Jesucristo, porque mi entendimiento viene de Él.

A mi familia, por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

A mis amigos, quienes siempre creyeron en mí.

Y, sobre todo, a quienes me dijeron que no podría.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
RESUMEN GRÁFICO	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
La 4ª revolución industrial y la manufactura de biopolímeros.....	5
¿Qué son los Polihidroxialcanoatos?.....	6
Generalidades del Poli(3-hidroxibutirato).....	7
Microorganismos productores de P3HB.....	9
<i>Bacillus</i> como un importante productor de P3HB.....	12
Sustratos económicos empleados para la producción de P3HB.....	13
Protocolos para la recuperación de P3HB.....	14
Problemas y alternativas.....	14
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS DEL TRABAJO	19

CAPÍTULO 1. Evaluación y selección de un medio de cultivo propicio para la generación de biomasa celular y la producción de poli(3-hidroxibutirato).....	20
Resumen.....	20
1. Introducción.....	21
2. Material y métodos.....	22
3. Resultados.....	25
4. Discusión.....	26
CAPÍTULO 2. Evaluación de parámetros nutricionales y de incubación para la mejora productiva de biomasa celular y poli(3-hidroxibutirato).....	27
Resumen.....	27
1. Introducción.....	28
2. Material y métodos.....	29
3. Resultados.....	32
4. Discusión.....	36
CAPÍTULO 3. Comportamiento cinético de <i>Bacillus cereus</i> 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A a nivel matraz y biorreactor.....	39
Resumen.....	39
1. Introducción.....	40
2. Material y métodos.....	41
3. Resultados.....	46
4. Discusión.....	54
CAPÍTULO 4. Caracterización fisicoquímica del biopolímero producido por <i>Bacillus cereus</i> 4N bajo la influencia de parámetros óptimos.....	58
Resumen.....	58
1. Introducción.....	59
2. Material y métodos.....	60

3. Resultados.....	64
4. Discusión.....	69
CAPÍTULO 5. Evaluación de un protocolo asistido por ultrasonido para la extracción de poli(3-hidroxibutirato).....	71
Resumen.....	71
1. Introducción.....	72
2. Material y métodos.....	73
3. Resultados.....	78
4. Discusión.....	85
CAPÍTULO 6. Impacto de los parámetros nutricionales sobre la morfología de <i>Bacillus cereus</i> 4N durante la acumulación de poli(3-hidroxibutirato).....	88
Resumen.....	88
1. Introducción.....	89
2. Material y métodos.....	90
3. Resultados.....	93
4. Discusión.....	96
CONCLUSIONES.....	98
PERSPECTIVAS.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	100
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	111
PRODUCTOS GENERADOS.....	112
ANEXOS.....	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Empresas productoras de P3HB a nivel mundial.....	8
Tabla 2. Producción de P3HB empleando diversos sustratos económicos.....	13
Tabla 3. Efecto de distintos sustratos como fuente de carbono.....	32
Tabla 4. Efecto de distintas concentraciones de jarabe de agave.....	33
Tabla 5. Efecto de distintos sustratos como fuentes de nitrógeno.....	33
Tabla 6. Efecto de distintas concentraciones de harina de soya.....	34
Tabla 7. Efecto de distintos tiempos de incubación.....	35
Tabla 8. Parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel matraz.....	51
Tabla 9. Parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel biorreactor en sistema discontinuo.....	54
Tabla 10. Resumen comparativo de cepas bacterianas productoras de P3HB.....	57
Tabla 11. Picos espectrales obtenidos por FTIR y ¹ H-RMN.....	65
Tabla 12. Propiedades térmicas obtenidas por DSC.....	66
Tabla 13. Propiedades cristalinas obtenidas por XRD.....	68
Tabla 14. Efecto de distintos medios de cultivo y protocolos de extracción.....	78
Tabla 15. Picos espectrales obtenidos por FTIR y ¹ H-RMN.....	80
Tabla 16. Propiedades térmicas obtenidas por DSC.....	82
Tabla 17. Propiedades cristalinas obtenidas por XRD.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Clasificación de los biopolímeros.....	6
Fig. 2. Estructura química general de los PHAs.....	7
Fig. 3. Fases y rutas metabólicas implicadas en la formación de P3HB.....	11
Fig. 4. Puntos críticos en la optimización de la producción de P3HB.....	15
Fig. 5. Efecto de distintos medios de cultivo en la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB).....	25
Fig. 6. Efecto de distintos parámetros de incubación (temperatura, pH y rpm) en la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB).....	35
Fig. 7. Armado y montaje del biorreactor.....	43
Fig. 8. Comportamiento cinético de <i>B. cereus</i> 4N a nivel matraz.....	47
Fig. 9. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}), consumo de fuente de carbono (gL^{-1}) y cambios en pH a nivel matraz (0.2 L).....	49
Fig. 10. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}), consumo de fuente de carbono (gL^{-1}) y cambios en pH a nivel matraz (1.0 L).....	50
Fig. 11. Comportamiento cinético de <i>B. cereus</i> 4N a nivel biorreactor.....	52
Fig. 12. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}), consumo de fuente de carbono (gL^{-1}) y cambios en pH a nivel biorreactor (10 L) en sistema discontinuo.....	53
Fig. 13. Espectros FTIR (izquierda) y ^1H -RMN (derecha).....	64
Fig. 14. Termogramas DSC.....	66
Fig. 15. Difractogramas XRD.....	67
Fig. 16. Microscopia SEM.....	68
Fig. 17. Espectros FTIR (izquierda) y ^1H -RMN (derecha).....	79
Fig. 18. Termogramas DSC.....	81

Fig. 19. Difractogramas XRD.....	83
Fig. 20. Microscopía SEM.....	84
Fig. 21. Imágenes por microscopía confocal de fluorescencia.....	94
Fig. 22. Esquematización geométrica de <i>B. cereus</i> 4N y de los carbonosomas de P3HB producidos bajo la influencia de distintas condiciones nutricionales.....	95
Fig. 23. Análisis de los parámetros geométricos de <i>B. cereus</i> 4N y de los carbonosomas de P3HB producidos bajo la influencia de distintas condiciones nutricionales.....	95

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Elementos y compuestos químicos

- **Ca:** Calcio.
- **CaCl:** Cloruro de calcio.
- **K₂HPO₄:** Fosfato dipotásico.
- **KCl:** Cloruro de potasio.
- **KH₂PO₄:** Difosfato de potasio.
- **Mg:** Magnesio.
- **MgSO₄:** Sulfato de magnesio.
- **N:** Nitrógeno.
- **NaCl:** Cloruro de sodio.
- **NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido.
- **NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
- **NaOCl:** Hipoclorito de sodio.
- **(NH₄)₂H₂PO₄:** Difosfato de amonio.
- **(NH₄)₂SO₄:** Sulfato de amonio.
- **O:** Oxígeno.
- **P:** Fósforo.
- **S:** Azufre.

Unidades

- **cm:** Centímetro.
- **cm⁻¹:** Longitud de onda.
- **gg⁻¹:** Gramos por gramo.
- **gL⁻¹:** Gramos por litro.
- **kHz:** Kilohercio.
- **kV:** Kilovoltios.
- **L:** Litros.
- **lbp:** Libras de presión.
- **m:** metros.
- **mA:** Miliamperios.
- **mg:** Miligramos.

- **mL:** Mililitros.
- **N:** Normalidad.
- **UFC mL⁻¹:** Unidades formadoras de colonia por mililitro.
- **vv⁻¹:** Volumen por volumen.
- **vvm:** Volumen de aire por volumen de medio por minuto.
- **W:** Watts.
- **W/g:** Flujo de calor.
- **° min⁻¹:** Grados por minuto.
- **°C:** Grados centígrados.
- **°C min⁻¹:** Grados centígrados sobre minuto.

Medios de cultivo

- **GRPD:** Medio rico en glucosa y deficiente en peptona.
- **K-R:** Medio Kannan-Rehacek.
- **M-A:** Medio Martínez-Alemán.
- **MMM:** Medio mineral modificado.
- **RC:** Medio *Rhizobium* modificado.
- **S-EL:** Medio sacarosa-extracto de levadura.

Biopolímeros

- **lcl-PHA:** PHAs de cadena larga.
- **mcl-PHA:** PHAs de cadena media.
- **scl-PHA:** PHAs de cadena corta.
- **PCL:** Policaprolactona.
- **PGA:** Ácido poliglicólico.
- **PHAs:** Polihidroxialcanoatos.
- **PLA:** Ácido poliláctico.
- **PVOH:** Alcohol polivinílico.
- **P3HB:** Poli(3-hidroxibutirato).

Métodos de caracterización fisicoquímica

- **DSC:** Calorimetría diferencial de barrido.
- **FTIR:** Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier.
- **¹H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protones.

- **SEM:** Microscopía electrónica de barrido.
- **XRD:** Difracción de rayos X.

Parámetros cinéticos y productivos

- **qp:** Velocidad de generación de producto.
- **Qp:** Productividad volumétrica de P3HB.
- **qs:** Velocidad de consumo de sustrato.
- **Td:** Tiempo de duplicación.
- **Y p/s:** Rendimiento producto sobre sustrato.
- **Y p/x:** Rendimiento producto sobre biomasa.
- **Y x/s:** Rendimiento biomasa sobre sustrato.
- **%P3HB:** Porcentaje de acumulación de P3HB.
- **μ:** Velocidad de crecimiento.

Propiedades térmicas y cristalinas

- **CrI_{P3HB}:** Índice de cristalinidad.
- **D_{hkl}:** Tamaño de cristal.
- **T_c:** Temperatura de cristalización.
- **T_d:** Temperatura de degradación.
- **T_m:** Temperatura de fusión.
- **X_c:** Grado de cristalinidad.
- **ΔH_m:** Entalpía de fusión.

Protocolos de extracción

- **US & SFE:** Protocolo de extracción con ultrasonido y libre de solventes.
- **NaOCl-Cloroformo:** Protocolo de extracción tradicional con NaOCl y cloroformo.

RESUMEN

La investigación en torno a la producción de biomateriales ha provocado múltiples esfuerzos para generar soluciones ante los retos ecológicos y económicos que se viven actualmente. Entre estos destaca la investigación del poli(3-hidroxibutirato) o P3HB; un biopolímero bacteriano con propiedades muy similares a la de algunos plásticos sintéticos cuya implementación ha destacado en diversas áreas. La trascendencia de este biopolímero radica en su producción, puesto que esta será importante en próximos años y traerá consigo diversos beneficios económicos. Por esta razón, el objetivo del presente proyecto se enfocó en optimizar la producción del P3HB producido por *Bacillus cereus* 4N y mejorar las propiedades físicas de este biopolímero. Los resultados demuestran que la formulación Martínez-Alemán (M-A) a base de jarabe de agave y harina de soya permite un incremento en la generación de biomasa celular y P3HB bajo condiciones óptimas de cultivo y al escalar este proceso a nivel biorreactor se aumentaron los rendimientos de producción. Asimismo, los análisis fisicoquímicos del P3HB obtenido demostraron características adecuadas para su uso en diversas áreas. Además, las propiedades térmicas y morfológicas de este biopolímero fueron mejoradas cuando se utilizó el protocolo de extracción US & SFE. También, se observaron cambios en la morfología de *B. cereus* 4N cuando fue inoculada bajo la influencia de distintos parámetros nutricionales, presentando un mejor desarrollo celular en el medio de cultivo M-A. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente proyecto indican una potencial alternativa para la producción de P3HB, puesto que se aumentó la productividad y se mejoraron sus propiedades físicas.

Palabras clave: *Agave tequilana* • *Bacillus* • bioplásticos • fermentación • polihidroxialcanoatos • US & SFE

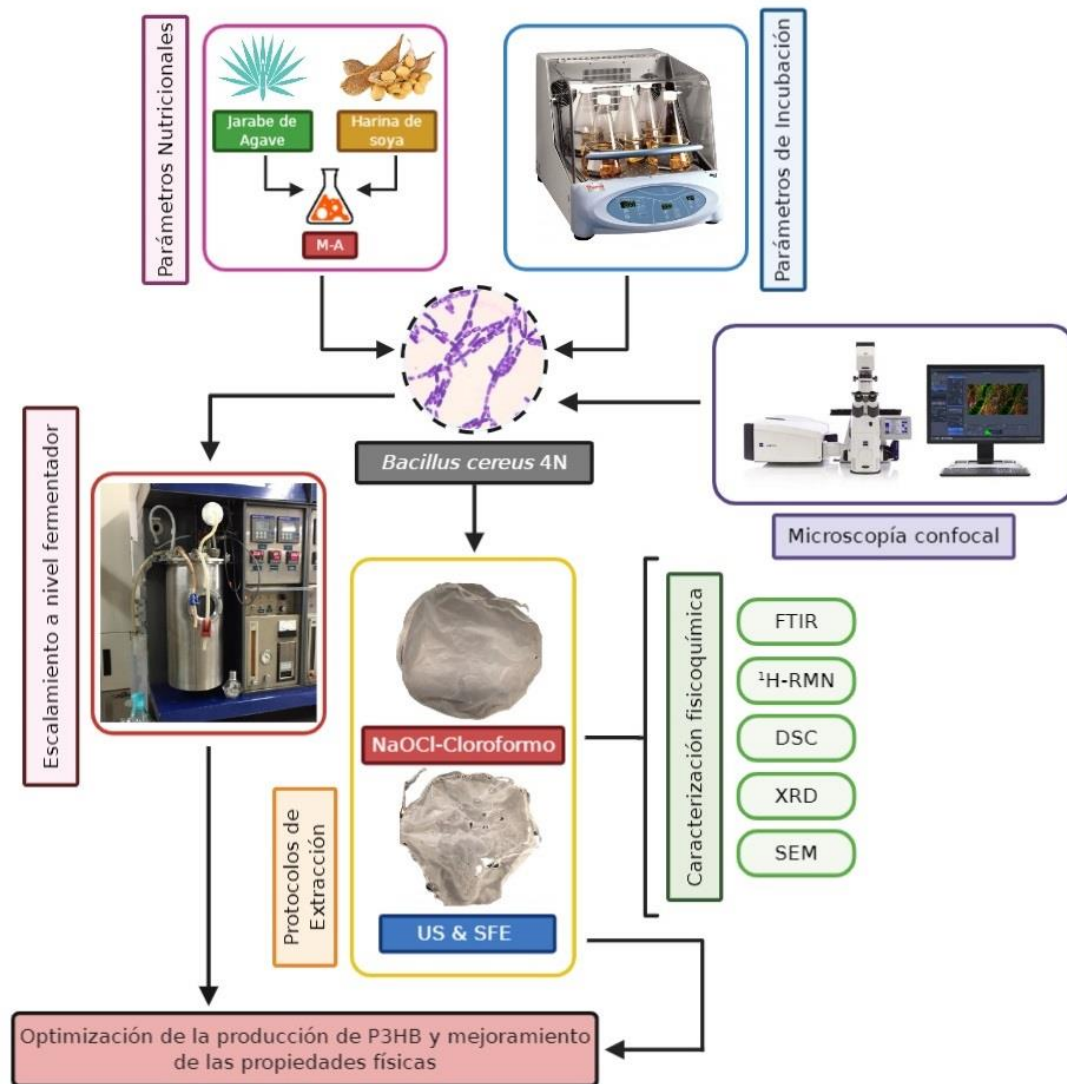
ABSTRACT

Research around the production of biomaterials has produced multiple efforts to generate solutions to the current ecological and economic challenges. Among these, stands out the research on poly(3-hydroxybutyrate) or P3HB; a bacterial biopolymer with similar properties to some synthetic plastics whose implementation has stood out in various areas. The importance of this biopolymer lies in its production since this will be important in the coming years and will bring with it various economic benefits. For this reason, the aim of the present project was focused on optimizing the P3HB production by *Bacillus cereus* 4N and improving the physical properties of this biopolymer. The results show that the Martínez-Alemán formulation (M-A) based on agave syrup and soybean-flour allows an increase in the generation of cellular biomass and P3HB under optimal cultivation conditions and by scaling this process at the bioreactor level, production yields were increased. Likewise, physicochemical analyses of the obtained P3HB showed suitable characteristics for its use in diverse areas. Furthermore, thermal and morphological properties of this biopolymer were improved when the US & SFE extraction protocol was used. Also, changes in *B. cereus* 4N morphology were observed when it was inoculated under the influence of different nutritional parameters, presenting a better cell development in the M-A growth medium. In conclusion, the results obtained in this project indicate a potential alternative for P3HB production, since productivity was increased, and its physical properties were improved.

Keywords: *Agave tequilana* • *Bacillus* • bioplastics • fermentation • polyhydroxyalkanoates • US & SFE

RESUMEN GRÁFICO

Martínez-Herrera, R. E. (2020). Estudio y optimización del rendimiento de producción de biopolímeros bacterianos de tipo Poli(3-hidroxibutirato). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.



INTRODUCCIÓN

La 4° revolución industrial es un proceso de transición tecnológica que ha propiciado la búsqueda de nuevos materiales poliméricos. En este aspecto, la biotecnología enfocada en la síntesis de biomateriales ha destacado, ya que es considerada como uno de los pilares en esta nueva tendencia (Keshavarz y Roy 2010; Oliván Cortés 2016). Los polímeros biodegradables (biopolímeros) han llamado la atención como biomateriales debido al potencial reemplazante que tienen sobre los plásticos de origen petroquímico (Ojha y Kapoor 2019) y a la sustentabilidad que ha buscado la humanidad durante años (Koller et al. 2011).

Dentro de la extensa variedad de biopolímeros reportados en la literatura destacan los polihidroxicanoatos (PHAs); una amplia familia de biopolímeros bacterianos producidos como un almacén de energía bajo la influencia de condiciones nutricionales desbalanceadas (Sukan et al. 2015). Dentro de los PHAs resalta el poli(3-hidroxibutirato) o P3HB, un biopolímero cuyas propiedades fisicoquímicas son muy similares a las del polipropileno; pero a diferencia de este, el P3HB es biodegradable, biocompatible y no es tóxico (Alves et al. 2017). Este biopolímero ha destacado en investigación e industria por su multifuncionalidad. Sin embargo, su alto costo de producción ha sido la principal limitante para su comercialización frente a los plásticos convencionales, puesto que su precio en el mercado es hasta 10 veces más costoso que el polipropileno, teniendo como puntos de mayor inversión los sustratos empleados durante el proceso de fermentación y los protocolos de extracción empleados para su recuperación (Sen et al. 2019). Es por esta razón, que múltiples esfuerzos en investigación y desarrollo de bioprocesos se han realizados con el objetivo de generar soluciones a este obstáculo permitiendo obtener maneras económicas y factibles de producir P3HB (Singh et al. 2019).

Dada la trascendencia e impacto en la producción de este biopolímero bacteriano, el presente proyecto tiene como finalidad optimizar la producción del P3HB producido por la cepa nativa *B. cereus* 4N y mejorar las propiedades físicas de este biomaterial, sugiriendo una alternativa que conlleve al desarrollo de esta tecnología y sus beneficios socio-económicos a nuestro país.

ANTECEDENTES

La 4° revolución industrial y la manufactura de biopolímeros

La 4° revolución industrial (Industria 4.0) es un proceso de transición que está viviendo la humanidad en estos años. Esta transición se basa en la digitalización de diversos aspectos de la vida humana, entre los cuales destaca el Internet de las cosas (IoT); es decir, el acceso a Internet a partir de diversos aparatos de uso común, los sistemas de ciberseguridad cada vez más complejos que tienen como objetivo erradicar el crimen cibernético, los avances en inteligencia artificial o robótica, las simulaciones y modelamientos matemáticos para predecir diversos acontecimientos sociales y económicos, y la bioeconomía, la cual hace referencia al uso aplicado de la biotecnología para la potencialización de diversos aspectos agrícolas, industriales y médicos (Oliván Cortés 2016).

El desarrollo de biomateriales ha sido un pilar importante para la Industria 4.0. Estos se definen como cualquier material que pueda interactuar con sistemas biológicos sin provocarle daño; presentando características como biodegradabilidad, biocompatibilidad, propiedades mecánicas similares a la de los materiales sintéticos, formación de estructuras y manufactura a mayor escala (Sathya et al. 2018). De acuerdo con Luengo (2018) los biomateriales se pueden clasificar en bioactivos (biomateriales que reaccionan a los fluidos corporales), biodegradables (biomateriales diseñados para degradarse) y bioinertes (biomateriales que pueden soportar largos periodos de tiempo en entornos corrosivos).

Dentro de la amplia gama de biomateriales existen los biopolímeros; los cuales son considerados como una alternativa a los plásticos derivados del petróleo, estos se clasifican de acuerdo con su origen y capacidad biodegradable (**Fig. 1**). Entre algunos ejemplos se menciona a los biopolímeros basados en recursos renovables: almidón y celulosa, los biopolímeros obtenidos de monómeros bioderivados: aceites vegetales y ácido poliláctico (PLA), los biopolímeros sintéticos: policaprolactona (PCL), alcohol polivinílico (PVOH) y ácido poliglicólico (PGA) y los biopolímeros obtenidos a partir de microorganismos: polihidroxialcanoatos (PHAs). Este último es el que más ha dado de que hablar porque sus propiedades de termoresistencia y de biodegradabilidad son mejores que la de los biopolímeros antes mencionados (Galego et al., 2000; Prados & Maicas, 2016).

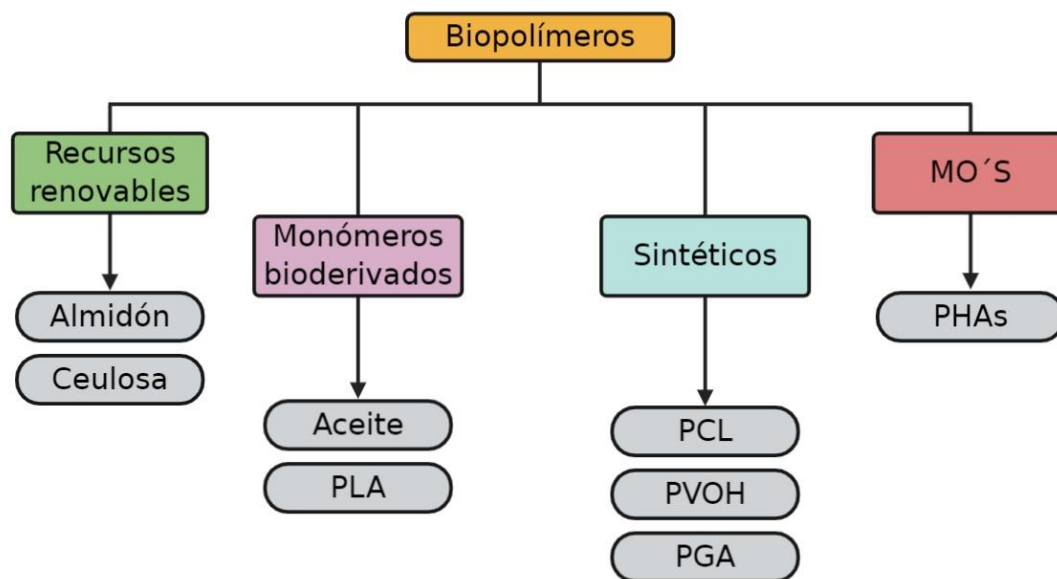


Fig. 1. Clasificación de los biopolímeros.

Actualmente, los problemas ecológicos suscitados y las políticas restrictivas que se han implementado con el objetivo de reducir el uso de plásticos de origen petroquímico han propiciado un avance en la investigación y manufactura de estos biopolímeros. Sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer para poder adoptarlos como un sustituto de los plásticos de origen sintético.

¿Qué son los polihidroxicanoatos?

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres alifáticos de cadena lineal conformados por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno cuya estructura general es una composición de (R) unidades monoméricas con una identidad determinada por estos bloques monoméricos (**Fig. 2**). Estos biopolímeros son acumulados a manera de gránulos citoplasmáticos (denominados como carbonosomas) por una amplia variedad de cepas bacterianas, dichos depósitos de energía presentan la ventaja de no afectar las condiciones fisiológicas del microorganismo (Albuquerque y Malafaia 2018).

Existe una amplia combinación de estos poliésteres debido a la extensa variedad de (R) unidades, las cuales determinan las propiedades fisicoquímicas de este biomaterial. Es sabido que la producción y calidad de los PHAs también depende de la naturaleza química del sustrato que es usado como fuente de carbono en el medio de cultivo, así como de las rutas metabólicas que el microorganismo posea para metabolizarlo (Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016).

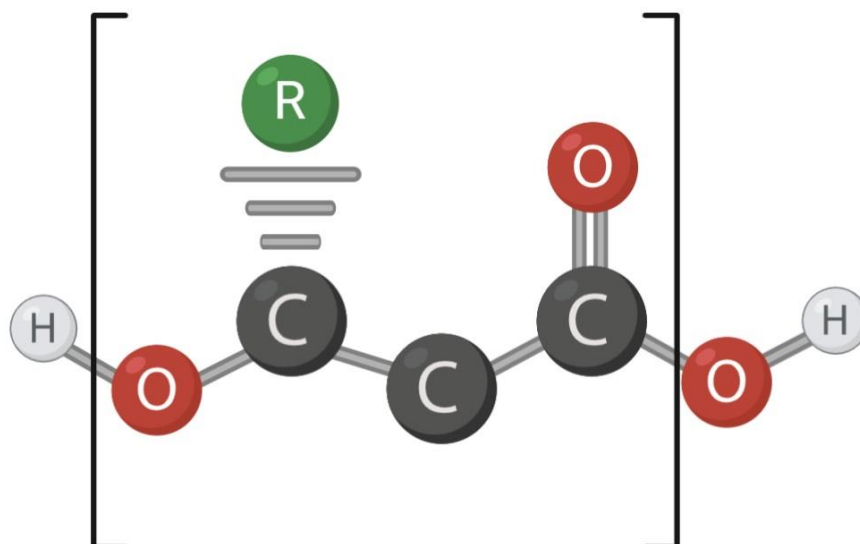


Fig. 2. Estructura química general de los PHAs.

Basado en el número de monómeros, los PHAs pueden clasificarse en tres grupos: **(1)** Los PHAs de cadena corta (scl-PHA) cuyos residuos tienen de 3-5 átomos de carbono y se caracterizan por presentar propiedades termoplásticas y cristalinas, **(2)** los PHAs de cadena media (mcl-PHA) cuyos residuos tienen de 6-14 átomos de carbono y se caracterizan por presentar propiedades elastómeras y de baja termoresistencia y **(3)** los PHAs de cadena larga o mixta (lcl-PHA) los cuales presentan más de 15 átomos de carbono y se caracterizan por ser mezclas entre los scl-PHA y mcl-PHA, siendo sus propiedades fisicoquímicas una combinación de ambas estructuras (Kourmentza et al. 2017).

Debido a todas estas propiedades que presentan los PHAs, estos biopolímeros han sido considerados como un biomaterial sustituto de los plásticos de origen sintético. Sin embargo, sus características biodegradables, biocompatibles y de nula toxicidad hacen que los PHAs tengan ventaja sobre los plásticos derivados del petróleo; aunado a ello, este biomaterial puede presentar propiedades reciclables y fertilizantes cuando es mezclado con materia orgánica, por lo que dichas particularidades lo convierten en una alternativa ecológica ante los problemas actuales de contaminación (Albuquerque y Malafaia 2018; Masood et al. 2015).

Generalidades del poli(3-hidroxibutirato)

El poli(3-hidroxibutirato) o P3HB es un homopolímero de scl-PHA que ha sido ampliamente caracterizado. Este es un biopolímero que presenta una cristalinización

polimórfica (semicristalino), además de que es considerado un biomaterial termorresistente debido a sus altas temperaturas de fusión y de degradación. Asimismo, sus altas propiedades tensiles lo hacen adecuado para cuestiones industriales, ya que estas son mejores que las presentadas por el polietileno, polipropileno, PVOH, PCL y PLA (Peña et al. 2014). La fórmula química del P3HB $(C_4H_6O_2)_n$ corresponde a 55.81% carbón, 7.03% hidrógeno y 37.16% oxígeno. Este es soluble en cloroformo, es hidrofóbico y presenta resistencia a cambios extremos de pH, aceites y luz UV (Alves et al. 2017).

El P3HB fue aislado por primera vez en 1926 por Maurice Lemoigne. Sin embargo, el interés industrial en este biopolímero comenzó en los años 60s cuando se observaron sus propiedades termorresistentes. En 1980, el P3HB fue producido por primera vez a nivel industrial por la empresa WR Grace and Company (E. U. A), pero los altos costos de producción ocasionaron la venta de sus patentes. Para el año 2012 diversas compañías dedicadas a la producción de P3HB colapsaron por la misma situación. No obstante, se prevé que para el 2025 habrá un aumento en la producción de este biopolímero debido a las recientes políticas establecidas en materia de ecología, las cuales están basadas en la restricción del uso de plásticos petroquímicos que han causado graves daños ambientales (Alves et al. 2017; Li et al. 2016).

A nivel mundial diversas empresas se han dedicado al desarrollo, producción y comercialización del P3HB (**Tabla 1**).

Tabla 1. Empresas productoras de P3HB a nivel mundial.

Empresa (País)	Año	Producción anual reportada (Toneladas)
Tianjin GreenBio Materials (China)	2010	6,000
Shenzhen Ecomann Biotechnology Co. (China)	2014	5,000
BluPHA (China)	2015	10,000
Kaneka Corp. (Japón)	2015	3,500
Danimer Scientific (E. U. A)	2016	3,500
Newlight Tech. (E. U. A)	2016	3,000
Metabolix (E. U. A)	2017	10,000
Bio-On (Italia)	2017	10,000
PHB Industrial (Brasil)	2017	3,000

(Alves et al. 2017; Kourmentza et al. 2017; Mozejko-Ciesielska y Kiewisz 2016).

El P3HB es un biopolímero cuya producción es escalable a nivel industrial y su producción va dirigida a diversos aspectos del desarrollo humano. Entre estos la agricultura, en donde se reporta su empleo para la producción de fertilizantes, la manufactura de redes agrícolas, bolsas para crecimiento y la síntesis de pesticidas de acción prolongada (Amelia et al. 2019). Mientras que a nivel industrial se reporta la fabricación de empaques, botellas, utensilios y contenedores para alimentos, la manufactura de pañales desechables y toallas higiénicas, recubrimientos aislantes para cables y coberturas para cartón o papel (Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016; Seoane et al. 2018). También, la síntesis química de agentes desengrasantes y precursores para el aumento del octanaje del biodiesel han sido considerados en esta área (Koller y Braunegg 2018). En medicina, el P3HB ha llamado la atención debido a sus propiedades biocompatibles, no tóxicas, adheribles y porosas; por lo que este biopolímero puede ser empleado para implantar tejidos, regenerar células, síntesis de andamios cardíacos, óseos y de cartílago, tratamientos hepáticos, nerviosos y periodontales. Asimismo, el P3HB puede ser utilizado como material para la síntesis de fármacos de liberación controlada (Masood et al. 2015), la fabricación de utensilios médicos, la manufactura de hilos para sutura, tornillos ortopédicos, parches, mallas y gasas (Ray y Kalia 2017).

Debido a las interesantes propiedades fisicoquímicas presentadas por el P3HB, la capacidad manufacturera a escala industrial y las múltiples aplicaciones en distintas áreas benéficas para el desarrollo humano, este biomaterial es considerado como el futuro reemplazante del polipropileno (Alves et al. 2017). Por lo tanto, la importancia de producir P3HB de manera óptima ha sido uno de los retos prioritarios en investigación.

Microorganismos productores de P3HB

La habilidad para biosintetizar y acumular P3HB como una reserva de carbono y energía está muy extendida entre los procariotas. Más de 300 especies han sido reportadas como productoras de este biopolímero. Sin embargo, no todos estos microorganismos pueden producir considerables cantidades de P3HB en grandes volúmenes de fermentación (Peña et al. 2014). Entre los principales productores de P3HB destacan *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus* sp., *Burkholderia sacchari*, *Chromobacterium violaceum*, *Cupriavidus*

necator, *Halomonas* sp., *Methylobacterium extorquens*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* y *Saccharophagus degradans*. Estas bacterias han llamado la atención de los investigadores debido a que pueden adaptarse a distintas condiciones nutricionales y de incubación para generar una alta producción de P3HB (Rehman et al. 2007).

Los microorganismos productores de P3HB también se clasifican de acuerdo con las condiciones que influyen para que puedan acumular este biopolímero. El primer grupo lo componen las bacterias que acumulan P3HB bajo la influencia de un exceso de fuente de carbono y la limitación de algún nutriente esencial como el N, O, P, S, Mg, Ca, etc. El segundo grupo lo conforman las bacterias que acumulan P3HB cuando existe algún agente estresante en el medio de cultivo como los ácidos orgánicos, detergentes, metales pesados, alcoholes o cuando se presentan cambios térmicos y de pH. Mientras que el tercer grupo lo componen las bacterias que pueden acumular P3HB bajo las condiciones estresantes antes mencionadas o bajo condiciones equilibradas de crecimiento (Aljuraifani et al. 2018; Pittmann y Steinmetz 2017).

Las bacterias son capaces de producir P3HB a partir de distintos sustratos como nutrientes. Para esto, diversas rutas metabólicas están implicadas en este proceso fisiológico los cuales pueden dividirse en 3 fases (**Fig. 3**). La primera fase abarca la toma del sustrato a través de un sistema de transmisión local en la membrana celular o mediante la difusión del compuesto en la célula. La segunda fase comprende las reacciones catabólicas y anabólicas centrales como la ruta de Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED), pentosa fosfato (PP), β -oxidación, síntesis de *Novo* de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos, las cuales convierten los compuestos en acetil-CoA; el sustrato principal para la biosíntesis de P3HB. Y la tercera fase es la ruta biosintética del P3HB, en la cual están involucradas las enzimas PhaA (3-cetotiolasa), PhaB (acetoacetil-CoA reductasa) y PhaC (PhaC sintasa) (Alves et al. 2017; Tan et al. 2014). Cabe destacar que estos procesos son dependientes de NADH y NADPH, los cuales llevan una función inhibidora de la citrato sintasa y aportan energía a las enzimas involucradas en la biosíntesis de P3HB (Tyo et al. 2010).

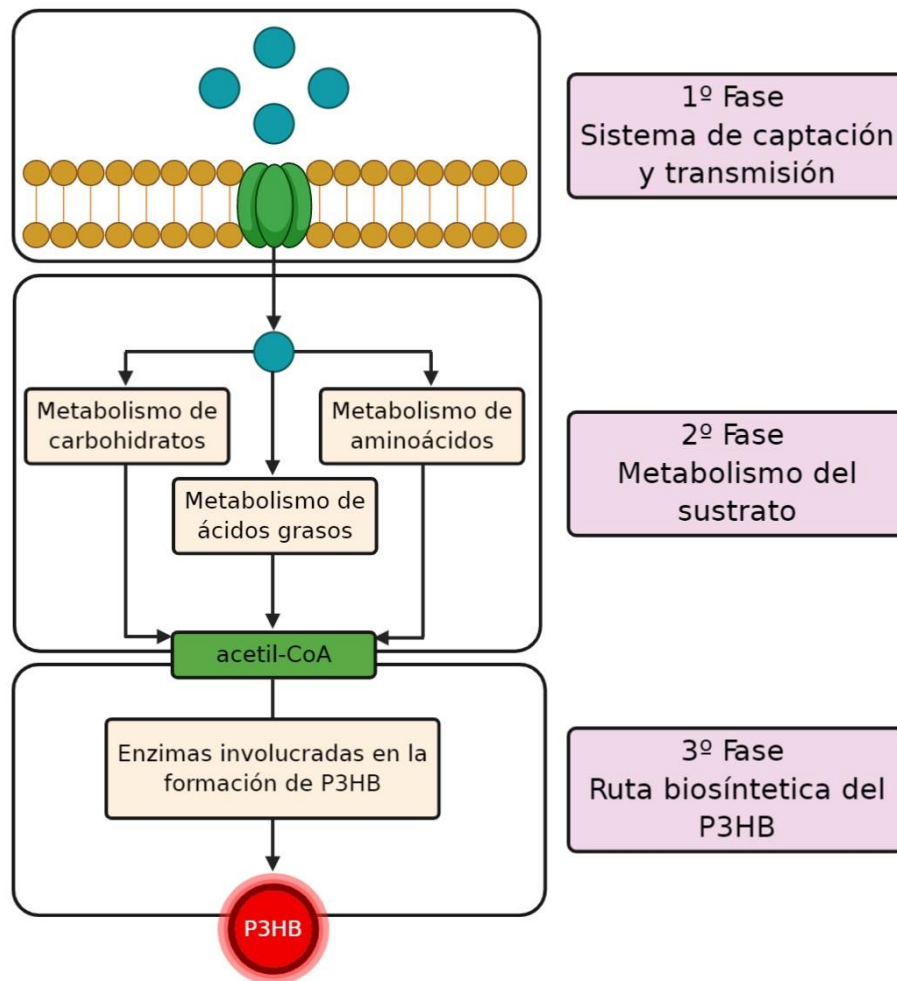


Fig. 3. Fases y rutas metabólicas implicadas en la formación de P3HB.

Diversos factores influyen en la cantidad y calidad del P3HB producido por el microorganismo empleado, entre estos destacan factores internos como la clase de PhaC sintasa (PhaC I, PhaC II, PhaC III y PhaC IV distribuidas en distintas cepas bacterianas y las cuales determinan las propiedades fisicoquímicas del biopolímero producido), la presencia de reguladores genéticos que están involucrados en la toma de diversos sustratos y la calidad del P3HB producido, así como la capacidad metabólica de la cepa bacteriana, puesto que el ecosistema de donde es aislada determina la versatilidad metabólica de la misma (Alves et al. 2017; Masood et al. 2015; Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016). Además, varios factores externos influyen en la productividad del microorganismo, entre los cuales se reporta la fuente de carbono y nitrógeno adicionadas al medio de cultivo, las condiciones de fermentación y el protocolo de extracción empleado; este último involucrado en la calidad del P3HB recuperado (Hernández-Núñez et al. 2019; Nielsen et al. 2017; Pradhan et al. 2017).

***Bacillus* como un importante productor de P3HB**

Dentro del amplio repertorio de cepas bacterianas productoras de P3HB las que más han llamado la atención de los investigadores son las del género *Bacillus*. Estas bacterias Gram positivas presentan ciertas ventajas sobre las Gram negativas; tales como la carencia de lipopolisacáridos (LPS), los cuales son endotoxinas resistentes a choques térmicos y agentes químicos que pueden contaminar el P3HB extraído provocando diversas respuestas inflamatorias cuando este es usado en cuestiones médicas (Tsuge et al. 2015). Asimismo, el género *Bacillus* se caracteriza por la capacidad de metabolizar sustratos de bajo costo ricos en azúcares, grasas, ácidos orgánicos y alcoholes debido a que puede secretar una amplia variedad de enzimas. Por lo que este género bacteriano propicia el abaratamiento del proceso de fermentación (Kumar et al. 2013). Además, las cepas de este género bacteriano se caracterizan por presentar altos rangos de crecimiento, lo cual repercute en un aumento en la productividad, así como la estabilidad genética de estas cepas bacterianas propicia una rápida estandarización de inóculos sin producir cambios metabólicos y productivos (Mohapatra et al. 2017). Debido a estas ventajas, *Bacillus* es visto como un importante productor de P3HB y su uso está cada vez más arraigado en distintas empresas internacionales productoras de este biomaterial (Albuquerque y Malafaia 2018).

Las cepas del género *Bacillus* se clasifican en dos grupos principales de acuerdo con la estructura del clúster genético *phaC* y algunas características metabólicas. El primer grupo es el de *Bacillus megaterium*, el cual está conformado por *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans* y *Bacillus brevis*. Este grupo se caracteriza por presentar el grupo de genes *phaQ* (regulador transcripcional), *phaP* (fasinas estructurales del carbonosoma), *phaR*, *phaB* y *phaC* (enzimas catalíticas para la biosíntesis de P3HB). Asimismo, se caracteriza por la producción de homopolímeros de P3HB bajo la preferencia de azúcares como fuente de carbono, por lo general el biopolímero obtenido de este grupo presenta propiedades altamente cristalinas (Pradhan et al. 2017; Tsuge et al. 2015).

El segundo grupo es el de *Bacillus cereus*, el cual está conformado por *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus toyonensis* y *Bacillus weisteophanensis*. Este grupo se caracteriza por presentar los genes *phaQ*, *phaJ*

(reguladores transcripcionales), *phaP* (fasinas estructurales del carbonosoma), *phaR*, *phaB* y *phaC* (enzimas catalíticas para la biosíntesis de P3HB). A diferencia del primer grupo, este se caracteriza por la producción de copolímeros de P3HB bajo la influencia de una amplia variedad de fuentes de carbono y el biopolímero recuperado presenta propiedades fisicoquímicas adecuadas para su uso en medicina (Evangeline y Sridharan 2019; Masood et al. 2013; Mizuno et al. 2010; Tsuge et al. 2015).

Sustratos económicos empleados para la producción de P3HB

Existen diferentes sistemas que han sido propuestos para la producción de P3HB empleando distintos sustratos de bajo valor económico (**Tabla 2**); entre los cuales destaca el uso de sustratos ricos en carbohidratos (melazas, jugos, jarabes y sueros lácteos), almidones (semillas y harinas), ácidos grasos (aceites residuales de origen vegetal o animal), ácidos orgánicos (ácido propiónico y acético) y lignocelulosa (bagazos y cáscaras de semillas, frutas y verduras) (Nielsen et al. 2017). El objetivo de usar este tipo de sustratos es abaratar el proceso de fermentación, puesto que representa la mayor inversión en el proceso productivo. No obstante, es igual de necesario emplear cepas bacterianas con la capacidad de adaptarse a estos nutrientes y generar considerables cantidades de biomasa y P3HB, ya que el proceso operativo está influenciado por el comportamiento de la cepa bacteriana empleada. (Rodríguez-Perez et al. 2018).

Tabla 2. Producción de P3HB empleando diversos sustratos económicos.

Cepa bacteriana	Sustrato	Sistema de fermentación	Biomasa (g/L)	P3HB (g/L)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Melazas	Discontinuo	10.54	2.17
<i>Alcaligenes latus</i>	Jugo de remolacha	Discontinuo	4.01	1.52
<i>Cupriavidus necator</i> mRePT	Suero de leche	Discontinuo	8.00	2.00
<i>Cupriavidus</i> sp. K KU38	Almidón de yuca	Discontinuo	9.69	5.96
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Aceite de soya	Alimentado	6.1	3.48
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aceite de maíz	Discontinuo	12.53	4.39
<i>Bacillus megaterium</i>	Café molido	Discontinuo	3.4	1.7
<i>Bacillus firmus</i> NII	Paja de arroz	Discontinuo	1.9	1.69

(Al-Battashi et al., 2019; Nielsen et al., 2017).

Protocolos para la recuperación de P3HB

Otro aspecto que destacar en la producción del P3HB son los protocolos de recuperación, puesto que diversas variantes han sido reportadas con el objetivo de eficientizar el proceso extractivo y mejorar las propiedades del P3HB. Comúnmente estos protocolos se subdividen en los siguientes pasos: (1) recuperación de biomasa celular, (2) digestión celular, (3) purificación del biopolímero y (4) suspensión final (Martínez-Herrera et al. 2020). De acuerdo con los agentes empleados durante los pasos en la extracción, estos protocolos se clasifican en biológicos, químicos y físicos; dentro de los cuales las diversas variantes han documentado el empleo de enzimas alcalinas durante la digestión celular y una suspensión final mediante ultrafiltración (Yasotha et al. 2006), el uso de detergentes durante el paso de digestión (Yang et al. 2011) y el uso de gusanos que consumen la biomasa bacteriana y la digieren liberando el P3HB en sus desechos (Murugan et al. 2016). Sin embargo, la desventaja de estos protocolos es que son operacionalmente largos, llegan a ser costosos, implican un alto uso de solventes químicos y el P3HB obtenido puede presentar baja pureza. Es por ello, que la investigación en torno a esta parte del proceso de producción ha estado dando de qué hablar, puesto que una parte de la reducción del costo operativo también está enfocada en el protocolo de extracción a emplear.

Investigaciones recientes han relacionado el empleo del baño de ultrasonido durante el paso de digestión celular con una eficiente recuperación del P3HB. Se ha documentado que reduce el uso de solventes químicos (por lo cual abarata el proceso de extracción y lo hace amigable con el ambiente), mejora las propiedades físicas del P3HB producido (puesto que este llega a tener mejores propiedades de termorresistencia y morfológicas) y aumenta los rendimientos de producción de este biopolímero (Ishak et al. 2016; Martínez-Herrera et al. 2020; Pradhan et al. 2017; Pradhan et al. 2018). Por lo tanto, el diseño de nuevos protocolos de extracción de P3HB a base de técnicas físicas es una parte fundamental en la optimización de la producción de este biopolímero bacteriano.

Problemas y alternativas

Hoy en día la producción de P3HB está pasando por una serie de dificultades que limitan su comercialización en el mercado mundial de los plásticos. El principal problema es su alto costo de producción que repercute en el precio final del producto,

el cual ronda los \$11-13 USD por kg, en contraste con el del polipropileno cuyo precio está fijado en \$0.80 USD por kg (Castilho et al. 2009; Pavan et al. 2019). Por esta razón se han dilucidado una serie de puntos críticos para abordar esta problemática (**Fig. 4**), siendo: **(1)** La bioprospección y el aislamiento de nuevas cepas bacterianas altamente productivas cuyo metabolismo les permita tomar diversos sustratos para producir P3HB (Shameer 2016). **(2)** La ingeniería genética aplicada a cepas nativas con el objetivo de incrementar la productividad (Li et al. 2016). **(3)** El diseño, modificación y optimización de medios de cultivo suplementados con sustratos residuales y económicos, siendo este el punto que más ha llamado la atención debido a que el 40-50% de la inversión se centra en los compuestos usados para el proceso de fermentación (Nielsen et al. 2017; Nygaard et al. 2019). **(4)** Evaluación y modelamiento de sistemas de fermentación centrados en la respuesta óptima del cultivo (Lin 2016). **(5)** Aplicación de nuevos protocolos de extracción con el objetivo de eficientizar la recuperación de P3HB, mejorar las propiedades físicas del biopolímero y disminuir el uso de solventes orgánicos (Kosseva y Rusbandi 2018; Pradhan et al. 2be18). **(6)** La búsqueda de nuevas áreas de aplicación y el mejoramiento mercantil para abrir su aceptación entre el público e incrementar su demanda (Carlozzi et al. 2020).

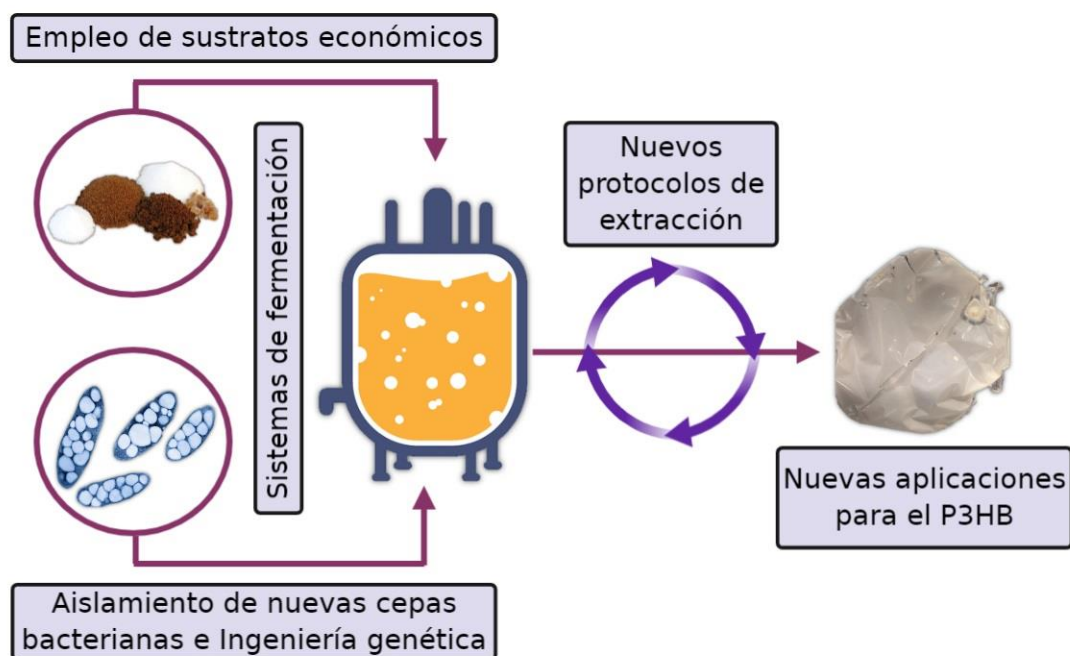


Fig. 4. Puntos críticos en la optimización de la producción de P3HB.

En la actualidad un vasto número de reportes describen la producción y caracterización del P3HB. No obstante, es importante mencionar que la investigación en torno a la producción de este biopolímero ha tenido una creciente evolución en la cual se ha visto que es cada vez necesario evidenciar la problemática y las alternativas convenientes, puesto que cada vez se descubren nuevas características interesantes que hacen que el P3HB sea considerado como un material futurista (Singh et al. 2019).

JUSTIFICACIÓN

Los recientes cambios que el mundo ha experimentado en cuestiones ecológicas y económicas han despertado el interés de la población por tecnologías que permitan un desarrollo sostenible. Debido a esto, la 4° revolución Industrial ha traído el amanecer de diversas tecnologías y procesos con la finalidad de facilitar y beneficiar la vida humana; entre estos destacan los procesos biotecnológicos enfocados en la síntesis de biomateriales, especialmente los polímeros biodegradables.

El poli(3-hidroxibutirato) o P3HB es un biopolímero bacteriano que destaca entre diversos biomateriales debido a sus propiedades fisicoquímicas que lo convierten en un potencial sustituto del polipropileno en diversos aspectos agrícolas, industriales y médicos. Sin embargo, los altos costos de producción causados por el uso de cepas bacterianas poco productivas, el empleo de sustratos costosos durante los procesos fermentativos, la aplicación de protocolos de extracción poco eficientes y la recuperación de P3HB altamente cristalino ha limitado la comercialización de este biopolímero frente a los plásticos de origen petroquímico.

Dada la situación actual, la importancia del presente proyecto radica en la búsqueda de alternativas que contribuyan al incremento de los rendimientos productivos del P3HB producido por una cepa nativa de *Bacillus cereus* y mejorar las propiedades físicas de este biopolímero. Además, la trascendencia del presente proyecto se centra en aportar al desarrollo de esta tecnología a beneficio de nuestro país, puesto que diversos informes indican que la producción de este biomaterial se incrementará y traerá grandes beneficios en un futuro próximo.

HIPÓTESIS

Los parámetros de fermentación óptimos y la aplicación de protocolos de recuperación eficientes permiten incrementar los rendimientos productivos del P3HB producido por *B. cereus* 4N y mejorar las propiedades físicas de este biopolímero.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Incrementar los rendimientos de producción del P3HB producido por *B. cereus* 4N y mejorar las propiedades físicas de este biopolímero mediante parámetros de fermentación óptimos y un protocolo de recuperación eficiente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar y seleccionar un medio de cultivo base que sea propicio para la generación de biomasa celular y la biosíntesis de P3HB.
- ❖ Evaluar y seleccionar sustratos alternos como fuentes de carbono y nitrógeno, así como la influencia de las distintas concentraciones de estos sustratos en el medio de cultivo. Asimismo, analizar la influencia de distintos parámetros de incubación (temperatura, pH, agitación y tiempo de fermentación) que permitan un incremento en la generación de biomasa celular y la producción de P3HB.
- ❖ Evaluar los parámetros cinéticos y de producción a nivel matraz (0.2 y 1 L) y nivel biorreactor en sistema discontinuo (10 L) bajo las condiciones nutricionales y de incubación previamente seleccionadas.
- ❖ Caracterización química (FTIR y ¹H-RMN) y física (DSC, XRD y SEM) del P3HB obtenido bajo las condiciones nutricionales y de incubación previamente seleccionadas.
- ❖ Evaluar un nuevo protocolo de extracción el cual eficiente la recuperación del P3HB.
- ❖ Evaluar mediante microscopía confocal de fluorescencia los cambios morfológicos presentados en la célula bacteriana y las inclusiones de P3HB bajo distintos parámetros nutricionales.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PROPICIO PARA LA GENERACIÓN DE BIOMASA CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Resumen

La selección de medios de cultivo que presentan una composición simple y que sirvan para la optimización de variables fisicoquímicas es el primer paso en el incremento productivo del P3HB. Una gran variedad de composiciones constituidas por sustratos inorgánicos y orgánicos son reportadas; sin embargo, la más adecuada será aquella en la que la cepa bacteriana empleada presente una mejor adaptación. Tomando en cuenta esto, el objetivo fue evaluar y seleccionar un medio de cultivo propicio para el desarrollo celular y la producción de P3HB por *B. cereus* 4N. Para esto se evaluaron 6 formulaciones previamente reportadas en la literatura; de las cuales el medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (GRPD) fue seleccionado debido a que permitió una alta generación de biomasa celular (3.67 gL^{-1}), P3HB (1.35 gL^{-1}) y %P3HB (36.13 %) con la cepa bacteriana en estudio. Dicho medio de cultivo será evaluado y modificado en posteriores análisis de optimización.

Palabras clave: *Bacillus* • biopolímeros • GRPD • medios de cultivo

1. Introducción

Uno de los factores que condicionan el crecimiento bacteriano y la producción del P3HB es la disposición de nutrientes; en este aspecto, es necesario el empleo de medios de cultivo de composición simple con un amplio radio de fuente de carbono-nitrógeno (C:N), los cuales deben ser fáciles de manipular y modificar para la optimización de estos procesos biotecnológicos (Keshavarz y Roy 2010). Asimismo, es reportado que estas condiciones nutricionales influyen en las características fisicoquímicas (composición, estructura, peso molecular, cristalinidad, termoresistencia, etc.) del biopolímero obtenido. Por lo que la selección del medio de cultivo es de suma importancia para la mejora productiva del P3HB (Tan et al. 2014).

Cabe destacar que los medios de cultivo usados para este fin presentan composición variada y dependen de la adaptación metabólica que la cepa bacteriana empleada presente ante tal influencia nutricional. Estudios extensos y detallados reportan el uso de medios de cultivo compuestos por sales minerales suplementados con uno o varios sustratos como fuente de carbono o nitrógeno (Peña et al. 2014). Por otra parte, los medios de cultivo compuestos por sustratos orgánicos también son una alternativa, puesto que algunos géneros bacterianos responden de mejor manera ante la presencia de estos sustratos (Benesova et al. 2017; Borah et al. 2002). Adicionalmente, la cepa bacteriana también juega un papel importante, puesto que en este contexto se destacan las características metabólicas del género *Bacillus*; un género bacteriano que se caracteriza por no presentar requerimientos nutricionales específicos, ya que pueden crecer y producir P3HB bajo la influencia de medios de cultivo equilibrados o desequilibrados suplementados con una amplia variedad de sustratos económicos (Kumar et al. 2013; Mohapatra et al. 2017).

Dadas las presentes razones, el objetivo del presente capítulo se centró en la búsqueda de un medio de cultivo referido como propicio para la producción de P3HB con el género *Bacillus*; con el cual la cepa bacteriana *B. cereus* 4N presente un incremento en la generación de biomasa celular, la producción de P3HB y el porcentaje de acumulación de este biopolímero, esto con el fin de considerarlo como un medio de cultivo base para realizar posteriores evaluaciones.

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos

Todos los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A).

2.2. Cepas bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Evaluación y selección de un medio de cultivo propicio para la generación de biomasa celular, producción de P3HB y %P3HB

Para evaluar y seleccionar el medio de cultivo en el cual *B. cereus* 4N presentara la mayor generación de biomasa celular, producción de P3HB y porcentaje de acumulación (%P3HB), se emplearon las siguientes composiciones reportadas como propicias para la producción de P3HB con cepas bacterianas del género *Bacillus*:

- Control: Caldo nutritivo (8.0 gL⁻¹).
- GRPD (medio rico en glucosa y deficiente en peptona): Glucosa (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹) (Masood et al. 2017).
- S-EL (medio sacarosa-extracto de levadura): Sacarosa (20.0 gL⁻¹), extracto de levadura (5.0 gL⁻¹), KH₂PO₄ (2.45 gL⁻¹), K₂HPO₄ (3.13 gL⁻¹) y CaCl (0.005 gL⁻¹) (Belal y Farid 2016; Bormann et al. 1998).
- MMM (medio mineral modificado): Almidón soluble (20.0 gL⁻¹), ácido cítrico (1.7 gL⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2.0 gL⁻¹), KH₂PO₄ (1.33 gL⁻¹) y MgSO₄ (1.2 gL⁻¹) (Ali y Jamil 2014).
- RC (medio *Rhizobium* modificado): Sacarosa (10.0 gL⁻¹), extracto de levadura (1.0 gL⁻¹), KH₂PO₄ (1.0 gL⁻¹) y MgSO₄ (2.0 gL⁻¹) (Ponnusamy et al. 2019).

- K-R (medio Kannan-Rehacek): Glucosa (20.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (5.0 gL⁻¹), KCl (3.0 gL⁻¹) y dializado de harina de soya (10.0 gL⁻¹) (Kannan y Rehacek 1970; Philip et al. 2009).

Los medios de cultivo antes mencionados fueron esterilizados a 120 °C, 15 lbp durante 15 min en una autoclave 25x-1 (All American, E. U. A).

2.3.1. Preparación de fermentaciones

La evaluación de los medios de cultivo fue llevada a cabo partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la preparación a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, esta fue inoculada con 100 µL (10⁸ UFC mL⁻¹) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y fue incubada con agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después, matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma preparación se inocularon al 2 % (vv⁻¹) con el pre-inóculo incubado durante 24 horas. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 48 horas.

2.3.2. Extracción de P3HB

El P3HB producido fue recuperado mediante el protocolo de extracción tradicional basado en la digestión celular con NaOCl y la suspensión del biopolímero en cloroformo (Hahn et al. 1994). De acuerdo con lo establecido, se colocaron los caldos del cultivo de 48 horas en botes de polipropileno, estos se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A); una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv⁻¹), se homogenizó y se reposo en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) a 30 °C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y a la pastilla resultante se le añadieron 9 mL de una mezcla de metanol, acetona y dietil éter (1:1:1), de nuevo se centrifugó y al obtener la pastilla se le añadieron 10 mL de cloroformo; el cual fue llevado a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en una caja Petri de cristal previamente pesada y se dejó secar a 24 °C.

2.3.3. Cuantificación de biomasa celular y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB)

De los caldos de fermentación de 48 horas se tomó una muestra de 10 mL de medio de cultivo y se distribuyó en 5 microtubos con volumen de 2 mL (previamente secos a 50 °C y pesados). Posteriormente, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga TM22R (Beckman Coulter, E.U.A), se desechó el sobrenadante, se enjuagó con agua destilada estéril y después se almacenaron a 50 °C durante 24 horas en un horno 07065M (ARSA, México). Pasadas 24 horas se cuantificó su peso (Nygaard et al. 2019).

El cálculo del porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB) fue determinado como la relación existente entre la cantidad de P3HB producido sobre la cantidad de biomasa celular generada (Pagliano et al. 2017), mediante la siguiente fórmula:

$$\%P3HB = \left[\frac{P3HB \text{ (gL}^{-1}\text{)}}{Biomasa \text{ celular (gL}^{-1}\text{)}} \right] * 100$$

2.4. Análisis estadísticos

Los procesos de fermentación fueron realizados por triplicado. Los datos de generación de biomasa celular, producción de P3HB y %P3HB fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba posterior de Tukey. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa. El software SPSSv20 fue usado para realizar estos análisis.

3. Resultados

En la **Fig. 5** se muestra el efecto de los medios de cultivo evaluados para la producción del P3HB por *B. cereus* 4N. Esta cepa bacteriana presentó una generación de biomasa celular de 1.29-3.67 gL⁻¹, una producción de P3HB de 0.09-1.35 gL⁻¹ y un %P3HB de 3.62-36.13% bajo la influencia de todos los medios de cultivo evaluados, siendo el medio de cultivo GRPD aquel que permitió una mayor generación de biomasa celular (3.67 gL⁻¹), P3HB (1.35 gL⁻¹) y %P3HB (36.13%).

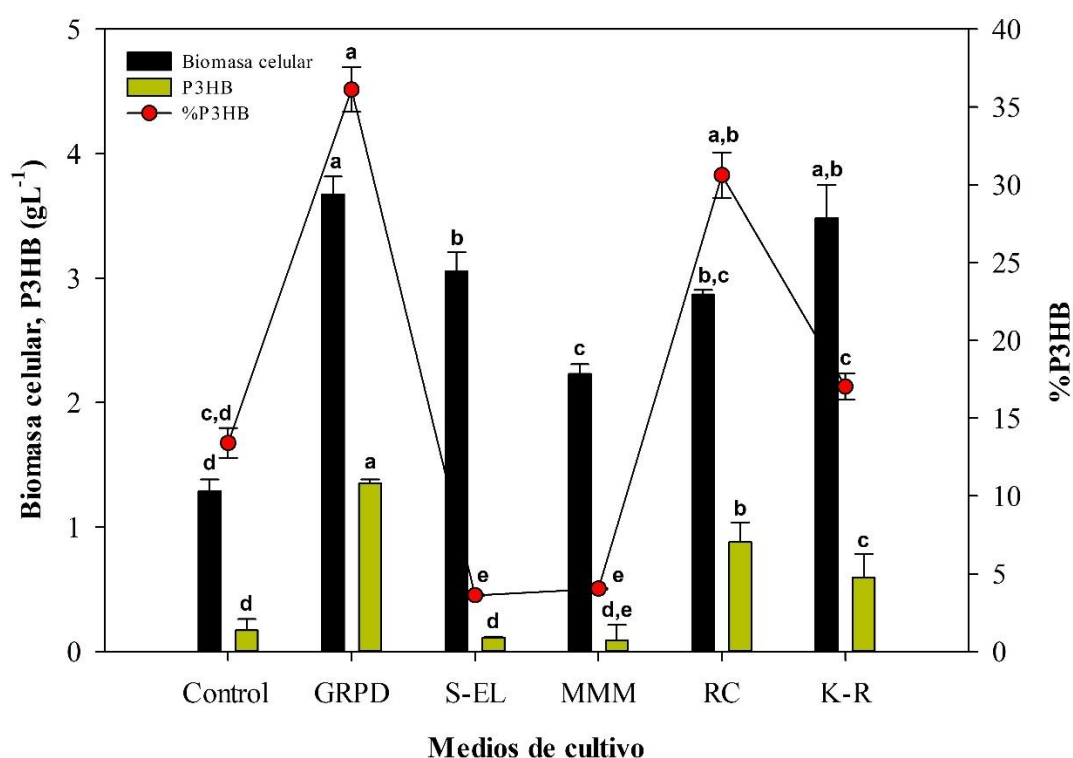


Fig. 5. Efecto de distintos medios de cultivo en la producción de biomasa celular (gL⁻¹), P3HB (gL⁻¹) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB). Los datos graficados corresponden a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar y los grupos de homogeneidad (a-e) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (ANEXO I).

También se observó que la generación de biomasa celular es estadísticamente similar entre los medios de cultivo GRPD y K-R. Asimismo, la producción de P3HB y el %P3HB es menor al emplear los medios de cultivo S-EL y MMM (estadísticamente similar al medio control). Infiriendo que los medios de cultivo que presentan un mayor contenido de sales inorgánicas afectan de manera negativa el desarrollo celular y la producción de P3HB de la cepa bacteriana empleada.

4. Discusión

La búsqueda de medios de cultivo simples que influyan positivamente en el desarrollo celular y la producción de P3HB es un paso de vital importancia en la optimización productiva de este biopolímero bacteriano (Masood et al. 2017). Es reportado que varias cepas del género *Bacillus* responden de manera favorable bajo la influencia de medios de cultivo compuestos por NaCl, extracto de levadura y radios óptimos de glucosa-peptona (Narayanan y Ramana 2012). Tal es el caso de *Bacillus cereus* FB11, una cepa bacteriana capaz de generar hasta 4.95 gL⁻¹ de biomasa celular y 1.95 gL⁻¹ de P3HB bajo la influencia del medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (Masood et al. 2013). De igual manera, *Bacillus cereus* PW3A presenta una máxima producción de P3HB (0.35 gL⁻¹) bajo la influencia de glucosa y peptona como sustratos óptimos (Babruwad et al. 2015) y *Bacillus flexus* Azu-A2, cuya generación de biomasa celular (3.21-3.61 gL⁻¹) y producción de P3HB (0.89-0.90 gL⁻¹) se vio favorecida ante la presencia de glucosa como fuente de carbono y la adición de extracto de levadura (fuente de aminoácidos y vitaminas esenciales) y peptona (fuente principal de nitrógeno). Adicionalmente, es reportado que *Bacillus aryabhatai* PHB10 presenta una máxima generación de biomasa celular (4.36 gL⁻¹) y producción de P3HB (3.26 gL⁻¹) bajo la influencia de un medio de cultivo con una composición nutricional similar a la presentada en este proyecto (Pillai et al. 2017).

No obstante, el uso de glucosa y peptona a nivel industrial repercute en un mayor costo del biopolímero, por lo que este medio de cultivo solo funciona como una base para realizar posteriores modificaciones empleando sustratos económicos. De acuerdo con Kung et al. (2007) aislados bacterianos de *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* sp. presentaron un buen desarrollo celular y producción de P3HB bajo la influencia del medio de cultivo GRPD. Sin embargo, este reporte indica que la producción de estas cepas bacterianas puede verse mejorada si se sustituye la glucosa y la peptona como sustratos principales. Asimismo, Getachew y Woldesenbet (2016) indican el uso de sustratos económicos para mejorar la producción de P3HB empleando el medio de cultivo GRPD como una base nutricional. Por lo tanto, en este primer paso el medio de cultivo GRPD fue seleccionado para realizar posteriores análisis debido a su composición simple, el alto desarrollo celular, producción de P3HB y porcentaje de acumulación presentado por *B. cereus* 4N.

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS NUTRICIONALES Y DE INCUBACIÓN PARA LA MEJORA PRODUCTIVA DE BIOMASA CELULAR Y POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Resumen

Actualmente, la búsqueda de sustratos económicos que permitan un abaratamiento del proceso de fermentación y un incremento en la biosíntesis de P3HB ha sido de gran interés en la optimización productiva de este biopolímero bacteriano. México es un país con una alta generación de sustratos de esta índole los cuales pueden destinarse para este proceso biotecnológico. Por esta razón, el objetivo del presente capítulo se enfocó en la evaluación de distintos parámetros nutricionales y de incubación en los que *B. cereus* 4N presentara una alta generación de biomasa celular y producción de P3HB. Los resultados obtenidos demuestran que la formulación compuesta por jarabe de agave (15 gL^{-1}), harina de soya (1.5 gL^{-1}), extracto de levadura (2.5 gL^{-1}) y NaCl (1.25 gL^{-1}) permite a la cepa bacteriana en estudio generar una mayor producción de biomasa celular y P3HB a condiciones de 30°C , pH 6, 150 rpm durante 48 horas de incubación.

Palabras clave: *Agave tequilana* • *Bacillus* • biopolímeros • M-A • polihidroxialcanoatos

1. Introducción

Actualmente, el P3HB es un biopolímero que se está produciendo a escala industrial por diversas empresas internacionales. Sin embargo, los altos costos de producción hacen que este biomaterial sea hasta 10 veces más costoso que los polímeros sintéticos, lo cual limita su competitividad en el mercado mundial de los plásticos (Kourmentza et al., 2017). Se estima que el costo final de este biopolímero depende del precio del sustrato utilizado. Por esta razón, los investigadores se han enfocado en buscar sustratos de bajo costo que ayuden a reducir los costos de fermentación, puesto que el 30-40 % de la inversión se dirige a los sustratos empleados para este proceso (Gómez Cardozo et al. 2016; Mozumder et al. 2014). Una amplia variedad de sustratos han sido reportados como fuente de carbono y nitrógeno; entre estos destaca el uso de melazas, mieles, jarabes, jugos, bagazos, cáscaras de fruta o verdura, almidones, harinas, hidrolizados, desechos lignocelulósicos, legumbres, aceites residuales de origen vegetal, animal o industrial, sueros lácteos, licores, efluentes residuales, entre otros (Nielsen et al. 2017). Por lo tanto, hay una infinidad de posibilidades para continuar optimizando la producción de este biopolímero.

México es un país donde el 52.4 % de sus desechos son de carácter orgánico putrescible siendo los residuos alimenticios derivados de industrias, mercados y tiendas de autoservicio los que principalmente componen este porcentaje. La falta de gestión para estos desechos representa un problema ecológico, puesto que la carencia de propuestas hace difícil eliminar su acumulación (Bernache et al. 2001).

Asimismo, las melazas, jarabes y mieles vegetales son sustratos ricos en carbohidratos fermentables que son obtenidos de plantas refinadoras de azúcar y dulceras regionales. Estos sustratos tienen una alta producción en México y debido a su bajo valor económico y su manufactura tradicional en algunas ciudades de nuestro país pueden ser dirigidos para diversos aspectos biotecnológicos (Martínez 2000; Martínez-Herrera et al. 2020).

Por lo anterior, el presente capítulo se centró en la evaluación y selección de sustratos de bajo costo como fuentes de carbono y nitrógeno, sus correspondientes concentraciones y el análisis de parámetros de incubación que permitan a la cepa *B. cereus* 4N incrementar la generación de biomasa celular, la producción de P3HB y el porcentaje de acumulación de este biopolímero.

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos y sustratos

Todos los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A). Mientras que los sustratos económicos utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno fueron obtenidos de mercados locales, restaurantes de comida rápida y talleres mecánicos en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.

2.2. Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Evaluación de sustratos económicos y condiciones de incubación

La evaluación de sustratos de bajo costo para incrementar la producción de P3HB fue realizada mediante un diseño de discriminación de variables denominado como un factor a la vez (Biglari et al. 2018; Masood et al. 2017; Wagle et al. 2017). Primero, se evaluaron diferentes sustratos como fuente de carbono (jarabe de agave, melaza de caña, bagazo de caña, cáscara de plátano, suero de leche, aceite residual de papa frita, aceite residual de pollo frito y aceite residual de motor) a una concentración de 15 gL⁻¹ en el medio de cultivo base (previamente seleccionado en el **Capítulo 1**) compuesto por extracto de levadura (2.5 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹). Se eligió aquel sustrato con el cual se mostró una mayor producción de biomasa celular, P3HB y %P3HB, y después se evaluaron distintas concentraciones (5, 10, 15 y 20 gL⁻¹). Se consideró como control (-) el medio de cultivo base sin fuente de carbono y como control (+) el medio de cultivo base suplementado con glucosa como fuente de carbono.

Después de seleccionar la fuente de carbono y su respectiva concentración, se analizaron distintas fuentes de nitrógeno (NH₄(SO₄)₂, harina de soya, harina de maíz,

nejayote, chícharos, frijoles y lentejas). Se seleccionó aquel sustrato con el cual se mostró una mayor producción de biomasa celular, P3HB y %P3HB, y después se evaluaron distintas concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 gL⁻¹). Se consideró como control (-) el medio de cultivo base sin peptona y como control (+) el medio de cultivo base suplementado con peptona como fuente de nitrógeno.

Los procesos de fermentación fueron llevados a cabo partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la preparación a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, esta fue inoculada con 100 µL (10⁸ UFC mL⁻¹) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y fue incubada con agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después, matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma preparación se inocularon al 2 % (vv⁻¹) con el pre-inóculo de 24 horas. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 48 horas.

Después de evaluar y seleccionar los mejores parámetros nutricionales se evaluó el efecto de distintos parámetros de incubación, tales como; temperatura (20, 30 y 40 °C), pH (6, 7 y 8), velocidad de agitación (100, 150 y 200 rpm) y tiempos de fermentación (24, 48, 72 y 96 horas) sobre la generación de biomasa celular, producción de P3HB y porcentaje de acumulación (%P3HB).

2.3.1. Extracción de P3HB

El P3HB producido fue recuperado mediante el protocolo de extracción tradicional basado en la digestión celular con NaOCl y la suspensión del biopolímero en cloroformo (Hahn et al. 1994). De acuerdo con lo establecido, se colocaron los caldos del cultivo de 48 horas en botes de polipropileno, estos se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A); una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv⁻¹), se homogenizó y se reposo en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) a 30 °C durante 2 horas (en el caso del paquete celular obtenido de los tratamientos con aceites, estos fueron lavados con acetona y agua destilada previo a la digestión con NaOCl). Posteriormente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y a la

pastilla resultante se le añadieron 9 mL de una mezcla de metanol, acetona y dietil éter (1:1:1), de nuevo se centrifugó y al obtener la pastilla se le añadieron 10 mL de cloroformo; el cual fue llevado a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en una caja Petri de cristal previamente pesada y se dejó secar a 24 °C.

2.3.2. *Cuantificación de biomasa celular y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB)*

A partir de los caldos de fermentación se tomó una muestra de 10 mL de medio de cultivo y se distribuyó en 5 microtubos con un volumen de 2 mL (previamente secos a 50 °C y pesados). Posteriormente, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga TM22R (Beckman Coulter, E.U.A), se deseó el sobrenadante, se lavó con agua destilada estéril y después se almacenaron a 50 °C durante 24 horas en un horno 07065M (ARSA, México). Pasadas 24 horas se cuantifico su peso (Nygaard et al. 2019).

El cálculo del porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB) fue determinado como la relación existente entre la cantidad de P3HB producido sobre la cantidad de biomasa celular generada (Pagliano et al. 2017), mediante la siguiente fórmula:

$$\%P3HB = \left[\frac{P3HB \text{ (gL}^{-1}\text{)}}{Biomasa \text{ celular (gL}^{-1}\text{)}} \right] * 100$$

2.4. *Análisis estadísticos*

Los procesos de fermentación fueron realizados por triplicado. Los datos de generación de biomasa celular, producción de P3HB y %P3HB obtenidos de la evaluación de los parámetros nutricionales y tiempos de fermentación fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), mientras que los datos derivados de la evaluación de los parámetros de incubación (temperatura, pH y velocidad de agitación) fueron evaluados mediante un diseño factorial 3×3. Para todos estos análisis se realizó una prueba posterior de Tukey. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa. El software SPSSv20 fue usado para realizar estos análisis.

3. Resultados

La información obtenida indica la versatilidad metabólica de *B. cereus* 4N para asimilar distintos sustratos de bajo costo (melazas, jarabes, bagazos y aceites), lo cual se refleja en la generación de biomasa celular y la producción de P3HB (**Tabla 3**). En este aspecto, el jarabe de agave indujo la mayor generación de biomasa celular (3.74 gL^{-1}), P3HB (2.09 gL^{-1}) y %P3HB (56.09 %); incluso los resultados obtenidos con esta fuente de carbono fueron superiores al control (+). En cambio, la producción más baja se obtuvo con el suero de leche cuyas variables presentaron un comportamiento estadísticamente similar al control (-), dicho comportamiento indica que la cepa bacteriana es incapaz de asimilar sustratos ricos en lactosa.

Tabla 3. Efecto de distintos sustratos como fuente de carbono.

Fuente de carbono	Biomasa celular (gL^{-1})	P3HB (gL^{-1})	%P3HB
Control (-)	$0.58^g \pm 0.04$	$0.12^g \pm 0.02$	$23.91^d \pm 1.70$
Control (+)	$3.67^a \pm 0.14$	$1.35^b \pm 0.03$	$36.13^b \pm 1.44$
Jarabe de agave	$3.74^a \pm 0.10$	$2.09^a \pm 0.05$	$56.09^a \pm 1.38$
Melaza de caña	$1.42^d \pm 0.03$	$0.40^d \pm 0.07$	$28.18^c \pm 0.04$
Bagazo de caña	$1.10^f \pm 0.02$	$0.17^f \pm 0.03$	$15.36^f \pm 0.29$
Cáscara de plátano	$1.32^e \pm 0.01$	$0.30^e \pm 0.02$	$24.23^c \pm 0.17$
Suero de leche	$0.57^g \pm 0.02$	$0.13^g \pm 0.01$	$21.08^{d,e} \pm 0.37$
Aceite residual de papa frita	$2.21^c \pm 0.02$	$0.18^f \pm 0.03$	$8.10^g \pm 0.06$
Aceite residual de pollo frito	$2.69^b \pm 0.07$	$0.80^c \pm 0.02$	$28.17^c \pm 0.47$
Aceite residual de motor	$2.18^c \pm 0.05$	$0.17^f \pm 0.03$	$7.95^g \pm 0.32$

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-g) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (**ANEXO II**). **Control (-):** Medio de cultivo sin fuente de carbono y **Control (+):** Medio de cultivo suplementado con glucosa.

Las concentraciones de jarabe de agave en el medio de cultivo base indican que una concentración de 15 gL^{-1} es propicia para el incremento productivo de las variables dependientes evaluadas. Sin embargo, bajas concentraciones (5 y 10 gL^{-1}) determinan una menor disponibilidad de los carbohidratos necesarios para el desarrollo celular y la producción de P3HB. En cambio, altas concentraciones de este jarabe (20 gL^{-1})

producen una saturación que afecta al desarrollo celular y la producción de P3HB (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de distintas concentraciones de jarabe de agave.

Concentración de Jarabe de agave	Biomasa celular (gL ⁻¹)	P3HB (gL ⁻¹)	%P3HB
5 gL ⁻¹	1.95 ^c ± 0.02	0.54 ^c ± 0.05	27.69 ^b ± 0.26
10 gL ⁻¹	3.24 ^b ± 0.02	0.96 ^b ± 0.02	29.48 ^b ± 0.18
15 gL ⁻¹	3.74 ^a ± 0.05	2.15 ^a ± 0.05	56.15 ^a ± 1.38
20 gL ⁻¹	3.26 ^b ± 0.06	0.51 ^c ± 0.04	15.64 ^c ± 0.04

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-c) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (ANEXO III).

La **Tabla 5** muestra la influencia de diferentes sustratos como fuente de nitrógeno con los cuales la cepa bacteriana *B. cereus* 4N presentó diferencias estadísticas en su comportamiento productivo, siendo las fuentes de nitrógeno orgánicas las más destacables para el incremento en la generación de biomasa celular y la producción de P3HB. Entre ellas la harina de soya, un sustrato que fue seleccionado debido a su bajo valor económico y con el cual la cepa bacteriana en estudio presentó una producción de P3HB estadísticamente similar al control (+). Por lo tanto, esta harina funciona como una fuente de nitrógeno orgánica que sustituye el uso de la peptona en el medio de cultivo base.

Tabla 5. Efecto de distintos sustratos como fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Biomasa celular (gL ⁻¹)	P3HB (gL ⁻¹)	%P3HB
Control (-)	2.40 ^g ± 0.04	1.27 ^g ± 0.08	53.08 ^d ± 2.43
Control (+)	3.74 ^b ± 0.01	2.10 ^a ± 0.05	56.09 ^{b,c} ± 1.38
NH ₄ (SO ₄) ₂	2.79 ^f ± 0.02	0.64 ^h ± 0.05	23.03 ^f ± 0.23
Harina de soya	3.65 ^c ± 0.02	2.01 ^{a,b} ± 0.09	55.17 ^c ± 0.47
Harina de maíz	4.47 ^a ± 0.02	1.47 ^f ± 0.02	32.89 ^e ± 0.56
Nejayote	3.32 ^{d,e} ± 0.02	1.98 ^c ± 0.07	59.43 ^a ± 2.01
Chícharos	3.27 ^e ± 0.05	1.84 ^d ± 0.02	56.08 ^{b,c} ± 0.77
Frijoles	3.43 ^d ± 0.24	1.70 ^e ± 0.05	49.75 ^d ± 3.38

Lentejas	3.28 ^e ± 0.02	1.90 ^{c,d} ± 0.03	57.68 ^b ± 1.13
----------	--------------------------	----------------------------	---------------------------

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-g) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (**ANEXO IV**). **Control (-)**: Medio de cultivo sin peptona y **Control (+)**: Medio de cultivo suplementado con peptona.

La evaluación de las concentraciones de harina de soya como fuente de nitrógeno (**Tabla 6**) indican que con una concentración de 1.5 gL⁻¹ se obtiene un incremento significativo en la generación de biomasa celular (5.01 gL⁻¹) y la producción de P3HB (2.20 gL⁻¹), pero este efecto reduce en un 12.66 % la acumulación de P3HB. Aun así, este resultado es prometedor, dado que como se había mencionado anteriormente, su bajo valor económico aunado al uso de bajas concentraciones en el medio de cultivo puede influir en el mejoramiento económico de la producción de este biopolímero. Por lo tanto, los parámetros nutricionales determinados permitieron la generación de una nueva formulación compuesta por jarabe de agave (15 gL⁻¹), harina de soya (1.5 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹), dicha composición fue denominada como el medio de cultivo Martínez-Alemán (M-A).

Tabla 6. Efecto de distintas concentraciones de harina de soya.

Concentración de Harina de soya	Biomasa celular (gL ⁻¹)	P3HB (gL ⁻¹)	%P3HB
0.5 gL ⁻¹	3.26 ^d ± 0.07	1.80 ^c ± 0.02	55.40 ^a ± 0.20
1.0 gL ⁻¹	3.48 ^c ± 0.05	1.61 ^d ± 0.09	46.41 ^b ± 0.93
1.5 gL ⁻¹	5.01 ^a ± 0.05	2.20 ^a ± 0.02	42.51 ^c ± 0.45
2.0 gL ⁻¹	3.65 ^b ± 0.02	2.01 ^b ± 0.09	55.17 ^a ± 0.47

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-d) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (**ANEXO V**).

En el caso de los parámetros de incubación (**Fig. 6**) se observó que la cepa bacteriana *B. cereus* 4N bajo la influencia del medio de cultivo M-A presentó generación de biomasa celular, producción de P3HB y %P3HB a condiciones de 20-40 °C, pH 6-8 y velocidades de agitación de 100-200 rpm. Teniendo un mejor comportamiento productivo a condiciones de 30 °C, pH 6 y 150 rpm (**Fig. 6b**). Asimismo, la información representada en la **Tabla 7** demuestra que el mejor tiempo para la producción de P3HB fue a las 48 horas de incubación (2.24 gL⁻¹ y 40.93 %),

posterior a este tiempo se observa un decremento en la producción de este biopolímero. También, se observó que después de la hora 48 la cepa bacteriana sigue creciendo y generando altas cantidades de biomasa celular (hasta 12.19 gL⁻¹ a las 96 horas de incubación).

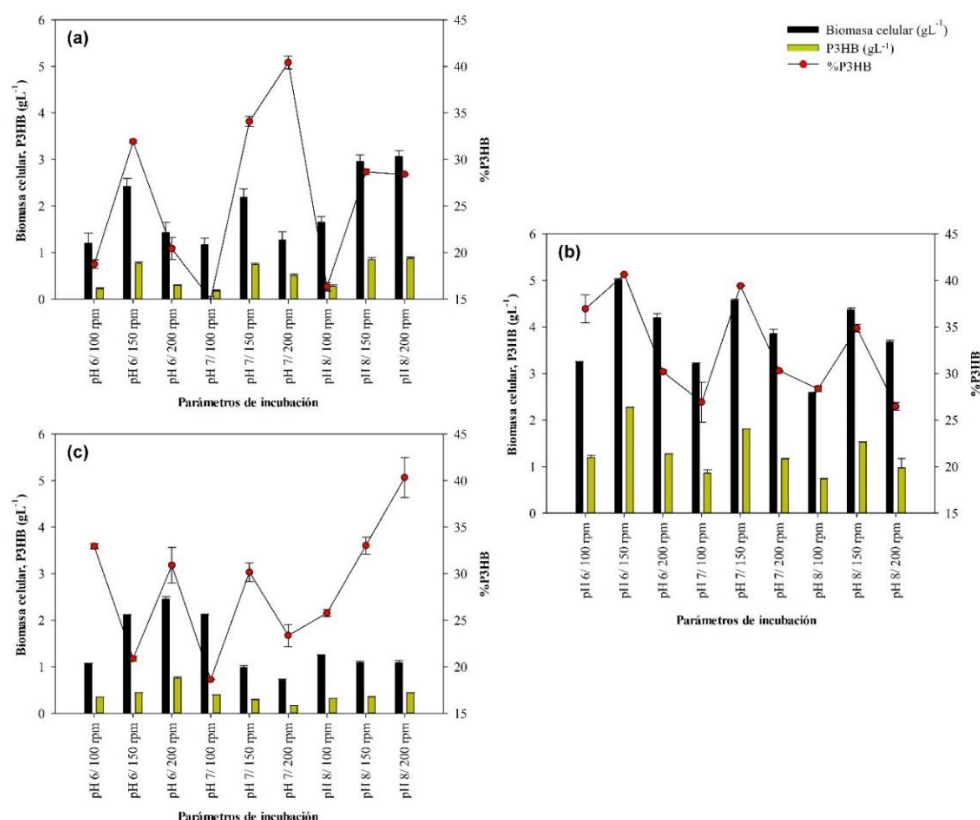


Fig. 6. Efecto de distintos parámetros de incubación (temperatura, pH y rpm) en la producción de biomasa celular (gL⁻¹), P3HB (gL⁻¹) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB). (a) 20 °C, (b) 30 °C y (c) 40 °C. Los datos graficados corresponden a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar (ANEXO VI).

Tabla 7. Efecto de distintos tiempos de incubación.

Tiempo de fermentación	Biomasa celular (gL ⁻¹)	P3HB (gL ⁻¹)	%P3HB
24 h	3.07 ^d \pm 0.05	1.09 ^d \pm 0.08	35.38 ^b \pm 2.27
48 h	5.20 ^c \pm 0.12	2.24 ^a \pm 0.02	40.93 ^a \pm 1.27
72 h	7.27 ^b \pm 0.08	1.66 ^b \pm 0.06	22.79 ^c \pm 0.32
96 h	12.19 ^a \pm 0.10	1.52 ^c \pm 0.01	12.42 ^d \pm 0.11

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-d) fueron determinados mediante la prueba posterior de Tukey ($p \leq 0.05$) (ANEXO VII).

4. Discusión

La búsqueda de nuevos sustratos económicos que aporten un incremento en la producción de P3HB es considerado uno de los puntos críticos para la optimización de este proceso. Tomando en cuenta la alta diversidad de residuos, subproductos e ingredientes de bajo costo que se generan en diferentes regiones a nivel mundial se abre la puerta a la mejora productiva de este biopolímero (Hernández-Núñez et al. 2019). En este trabajo se destaca el uso del jarabe de agave como una fuente de carbono propicia para la producción de P3HB por *B. cereus* 4N. Este jarabe se produce tradicionalmente a partir del cocimiento de las piñas de la planta de *Agave tequilana* Weber (comúnmente denominada “maguey”), el cual es un jarabe constituido por fructosa (más del 60 % de su contenido) y el resto se compone de glucosa, sacarosa y pequeñas trazas de fructooligosacáridos (FOS) (Velázquez Ríos et al. 2019). Asimismo, se reporta que este jarabe es producido por diversas comunidades rurales del pacífico y centro de México en cantidades de 724,000 toneladas anuales y debido a su bajo costo (el costo varía de 10-40 pesos mexicanos dependiendo de la región), tiene un amplio uso como sustituto de la glucosa, destacando que su producción es una importante fuente de ingresos para estos pueblos agrícolas dedicados a la cosecha del agave, por lo que un nuevo uso puede generar un importante valor agregado a este sustrato (Montañez Soto et al. 2011; Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer 2009).

Es reportado que los sustratos ricos en fructosa son más eficientes que otros azúcares fermentables para las cepas de género *Bacillus*. Esto se debe a los cambios metabólicos que se producen frente a este azúcar, puesto que la formación de acetyl-CoA mediante el complejo de la vía piruvato deshidrogenasa incrementa los niveles de NADH (Ouhib-Jacobs et al. 2009). Por lo tanto, el flujo de este poder reductor inhibe la actividad de la citrato sintasa (enzima previa del ciclo de Krebs) y redirige las moléculas de acetyl-CoA a la ruta biosintética del P3HB (Ling et al. 2018). Asimismo, estudios previos indican que los sustratos ricos en fructosa son propicios para la producción de este biopolímero; tal es el caso del jarabe de dátil, el cual se ha observado que estimula la producción de P3HB en un 70.5 % empleando cepas de *Bacillus* (Khiyami et al. 2011). También, el uso de la pulpa de caroba ha sido reportado como un sustrato de bajo costo que incrementa la producción de P3HB (hasta en 1.65 gL⁻¹) con *Bacillus megaterium*, incluso presenta un mejor efecto que los sustratos ricos en glucosa y sacarosa (Salazar et al. 2014). A su vez, es reportado que los jarabes

industriales altos en fructosa incrementan la producción de este biopolímero bacteriano en un 94.62 % por *Halomonas* sp. YLGW01 (Park et al. 2020).

En este trabajo se reporta que la cepa bacteriana en estudio presenta una mayor generación de biomasa celular y P3HB bajo la influencia de distintas fuentes de nitrógeno orgánicas. Esto concuerda con lo reportado por Borah et al. (2002), quienes encontraron que el empleo de fuentes de nitrógeno inorgánicas suprime la acumulación de P3HB en *Bacillus mycoides* RLJ B-017, señalándose que el origen de la cepa bacteriana influye de manera significativa en su capacidad metabólica. Asimismo, el estudio reportado por Benesova et al. (2017) indica que las fuentes de nitrógeno orgánicas y complejas reducen la fase de adaptación del cultivo e incrementan la generación de biomasa celular catalíticamente activa. Dentro de las fuentes de nitrógeno orgánicas evaluadas la que más destaco por el aumento en la cantidad de biomasa celular y P3HB fue la harina de soya. Esta harina es una materia prima renovable y de bajo costo cuyo contenido rico en aminoácidos esenciales (ácido glutámico, glicina, arginina, metionina, y ácido aspártico) permite su uso para diversos aspectos biotecnológicos (Liu et al. 2017; Salazar-Magallon et al. 2015). Cabe destacar el uso de la harina de maíz y el nejayote como fuentes de nitrógeno con los cuales se obtuvieron buenos resultados en cuanto a generación de biomasa celular y producción de P3HB. Sin embargo, estos sustratos presentan composiciones muy variadas, puesto que dependen de las formulaciones empleadas para el procesamiento del maíz (nixtamalización) e incluso; en el caso del nejayote, se ocupa un pretratamiento para degradar la presencia de polisacáridos complejos que limitan su metabolismo (Martínez-Herrera et al. 2020; Ramírez-Romero et al. 2013).

El análisis de diferentes parámetros de incubación indicó que *B. cereus* 4N bajo la influencia de los parámetros nutricionales determinados (medio de cultivo M-A), presenta un incremento en la generación de biomasa celular (5.20 gL^{-1}), producción de P3HB (2.24 gL^{-1}) y el %P3HB (40.93 %) a condiciones de 30 °C y 150 rpm. Dicho hallazgo concuerda con el reporte de Pillai et al. (2017), el cual informa que *Bacillus aryabhatai* presenta un mejor comportamiento productivo a 31 °C y 150 rpm debido al balance óptimo en la transferencia de biomasa y los niveles de oxígeno disuelto que se producen bajo estas condiciones de incubación. Sin embargo, a diferencia de este antecedente, los resultados indican que el mejor desarrollo celular y producción de

biopolímero se presentan a pH 6. Es reportado que los pH ligeramente ácidos (6.0-6.8) permiten la síntesis de acetoína (molécula precursora del almacenamiento de energía), reduce la producción y actividad del superóxido dismutasa “SOD” (enzima precursora de la esporulación) y reduce la actividad de la Pha depolimerasa “PhaZ” (enzima relacionada a la degradación de los carbonosomas de P3HB) (Akaraonye et al. 2011; Kominek y Halvorson 1965; Valappil et al. 2006). Por consiguiente, esta condición ligeramente ácida del medio de cultivo produce cambios fisiológicos en *B. cereus* 4N y es considerada óptima para la producción de biomasa bacteriana y P3HB.

En este estudio se observó que la mayor biosíntesis de P3HB fue a las 48 horas de fermentación. Sin embargo, posterior a este tiempo se reduce la cantidad de biopolímero producido y se incrementa la cantidad de biomasa celular. Este resultado es consistente con el reporte de Masood et al. (2017), quienes indicaron que la mayor acumulación de biopolímero por *Bacillus cereus* FA11 fue a las 48 horas de incubación. Después de este tiempo, el biopolímero acumulado se consume debido a la inanición de nutrientes en el medio de cultivo, lo que obliga a la bacteria a utilizar este depósito como último recurso; el cual, más que dirigirse a la biosíntesis de P3HB, es destinado a mantener las necesidades energéticas de la célula bacteriana (Getachew y Woldeesenbet 2016; Urtuvia et al. 2018). Por ende, los parámetros nutricionales y de incubación determinados en este capítulo son determinantes para realizar posteriores análisis cinéticos y productivos.

CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE *Bacillus cereus* 4N BAJO LA INFLUENCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO GRPD Y M-A A NIVEL MATRAZ Y BIORREACTOR

Resumen

El P3HB es un biopolímero bacteriano cuya producción puede escalarse a altos volúmenes de fermentación. Sin embargo, para llevar a cabo este bioproceso es necesario realizar estudios previos acerca del comportamiento cinético de la cepa bacteriana empleada para este fin. Por esta razón, el objetivo del presente capítulo fue realizar evaluaciones a nivel matraz y biorreactor (sistema discontinuo) con la cepa bacteriana *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A. Los resultados mostraron cambios en el pH durante el desarrollo celular en ambos medios de cultivo y una máxima generación de biomasa celular (7.20 gL^{-1}), P3HB (4.75 gL^{-1}) e incremento de los parámetros cinéticos y de productividad en el medio de cultivo M-A a nivel biorreactor. Por lo tanto, la influencia del medio de cultivo M-A bajo escalamiento a nivel biorreactor fue propicia para incrementar la producción de este biopolímero bacteriano.

Palabras clave: *Bacillus* • biopolímeros • bioprocesos • poli(3-hidroxibutirato) • productividad • rendimiento

1. Introducción

El P3HB es un biopolímero que puede ser producido a escala industrial. Sin embargo, para llevar a cabo este proceso es necesario estudiar de manera preliminar el comportamiento cinético de las cepas bacterianas bajo condiciones de crecimiento óptimas (Braunegg et al. 1995). Este tipo de evaluación facilita el análisis de datos, puesto que estos muestran el proceso de formación de los productos de interés a través del tiempo de fermentación; en este caso, la generación de biomasa celular y el biopolímero. Siendo esencial la información recabada acerca de los rendimientos de producción y la bioconversión de los sustratos empleados, los cuales definen la capacidad productiva (Divyashree et al. 2009).

Diferentes estrategias han sido documentadas para la producción de P3HB; ya sea, empleando cultivos puros o co-cultivos de cepas nativas o recombinantes y el modo operativo del biorreactor (Keshavarz y Roy 2010). Este último puede ser en sistema discontinuo (batch), el cual es una modalidad simple de fermentación basada en un sistema cerrado que involucra la adición de sustratos al principio y la recuperación del producto al final del proceso. Interesantemente, las fermentaciones discontinuas han sido ampliamente reportadas como propicias para la investigación de la influencia de los nutrientes, condiciones de incubación y la bioconversión de sustratos en biomasa celular y P3HB, así como la generación de modelos matemáticos predictivos (Kaur 2015). De igual forma se reporta el uso de sistemas alimentados (fed-batch) y continuos, los cuales son derivados de los sistemas discontinuos. Dichos sistemas pueden incrementar hasta en un 200 % la productividad del P3HB (Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016). Sin embargo, para poder emplear estas estrategias a nivel industrial se necesitan condiciones de operación adecuadas y un buen conocimiento del desarrollo de la cepa bacteriana bajo parámetros óptimos, puesto que se pueden producir grandes pérdidas (Kaur 2015).

Con el objetivo de conocer el comportamiento cinético de la cepa bacteriana en estudio bajo condiciones de crecimiento que permiten un incremento de biomasa y P3HB; en el presente capítulo se evaluaron los parámetros cinéticos y de producción que presenta *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y Martínez-Alemán (M-A) a nivel matraz (0.2, 1.0 L) y biorreactor en sistema discontinuo (10 L).

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos y sustratos

Todos los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A). Mientras que el jarabe de agave y la harina de soya utilizados como sustratos fueron obtenidos de mercados locales en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.

2.2. Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Medios de cultivo empleados

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo con los siguientes medios de cultivo:

- GRPD (medio rico en glucosa y deficiente en peptona): Glucosa (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹) (Masood et al. 2017).
- M-A (medio Martínez-Alemán): Jarabe de agave (15.0 gL⁻¹), harina de soya (1.5 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).

Los medios de cultivo fueron ajustados a pH 6.0 con un potenciómetro OrionStar A214 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) y esterilizados a 120 °C, 15 lbp durante 15 min en una autoclave 25x-1 (All American, E. U. A) para cinéticas a nivel matraz y en autoclave vertical SM301 (Yamato, Japón) para cinéticas a nivel biorreactor.

2.4. Evaluación del crecimiento bacteriano y los parámetros cinéticos y productivos

2.4.1. Cinéticas a nivel matraz

Para llevar a cabo las cinéticas de producción a nivel matraz se partió de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL del medio de cultivo a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, se inoculó con 100 μL (10^8 UFC mL^{-1}) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y se incubó en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después, matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL y matraces Erlenmeyer de 2000 mL con un volumen de 1000 mL de la misma preparación; se inocularon al 2 % (vv^{-1}) con el matraz pre-inóculo. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en incubadoras MaxQ4000 y MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 96 horas.

2.4.2. Cinéticas a nivel biorreactor en sistema discontinuo

Para las cinéticas a nivel biorreactor se empleó un fermentador MF-114 (New Brunswick Scientific, R. U) con un tanque de acero de 14 L y diámetro de 0.21 m. Este fue equipado con un analizador de pH Ingold 2300 (Mettler Toledo, E. U. A) y una chaqueta de acero con 2 impulsores tipo Rushton de 6 paletas con diámetro de 0.07 m separados uno de otro a 0.10 m sobre el eje del rotor. Para llevar a cabo los análisis correspondientes se empleó un volumen de trabajo de 10 L (equivalente a 0.46 m) del medio de cultivo a evaluar (**Fig. 7**).

Las cinéticas evaluadas en este nivel se llevaron a cabo en un sistema discontinuo. Para realizar estos análisis se partió de un matraz Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL del medio de cultivo a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, se inoculó con 100 μL (10^8 UFC mL^{-1}) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y se incubó con agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después, un matraz Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL se inoculó al 2 % (vv^{-1}) con el matraz pre-inóculo. Luego, este matraz se incubó con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Posteriormente, el biorreactor fue inoculado con el volumen

de este último matraz (equivalente al 2 % vv^{-1}) bajo condiciones estériles. Los experimentos a nivel biorreactor fueron llevados a cabo durante 48 horas de acuerdo con los parámetros reportados por Philip et al. (2009), donde se indica la producción de P3HB con la cepa *B. cereus* SPV bajo condiciones de 30 °C, 250 rpm, presión de oxígeno disuelto del 10% y velocidad de aireación de 1 vvm.

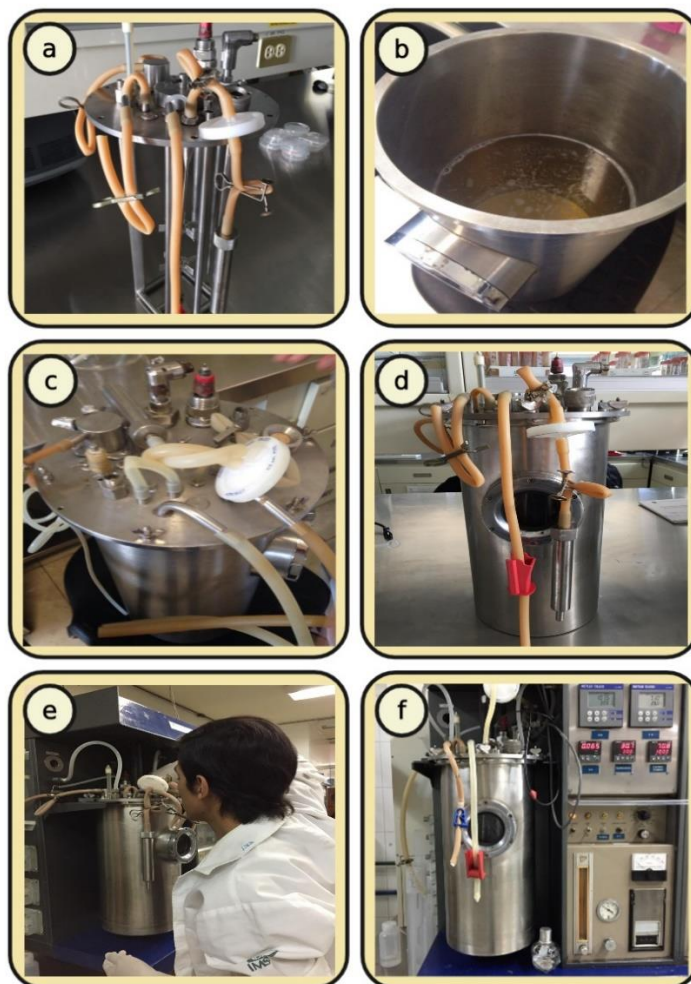


Fig. 7. Armado y montaje del biorreactor. **a)** Armado de chaqueta de acero, **b)** vaciado del medio de cultivo, **c)** ensamble y ajuste de tanque, **d)** armado final del tanque y esterilización, **e)** montaje del tanque en consola y **f)** configuración de condiciones de cultivo en consola.

El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante ensayos espectrofotométricos en un espectrofotómetro GENESYS (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) con una absorbancia de 620 nm. Una muestra de 2 mL del medio de cultivo estéril y sin inocular fue utilizada como blanco para calibrar del equipo. Además, se tomaron muestras durante todo el proceso de fermentación para la evaluación de los cambios de pH, la determinación de la generación de biomasa celular, producción de P3HB y consumo

de fuente de carbono. Este procedimiento fue realizado en todas las cinéticas de crecimiento realizadas a nivel matraz y biorreactor.

2.5. Métodos analíticos

2.5.1. Extracción de P3HB

El P3HB producido fue recuperado mediante el protocolo de extracción con NaOCl y cloroformo (Hahn et al. 1994). Se colocaron las muestras en botes de polipropileno, estos se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A); una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv⁻¹), se homogenizó y se reposo en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) a 30 °C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y a la pastilla resultante se le añadieron 9 mL de una mezcla de metanol, acetona y dietil éter (1:1:1), se volvió a centrifugar y al obtener la pastilla se le agregaron 10 mL de cloroformo; el cual se llevó a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en cajas Petri de cristal y se dejó secar a 24 °C.

2.5.2. Cuantificación de biomasa celular

A partir de los caldos de fermentación se tomó una muestra de 10 mL de medio de cultivo y se distribuyó en 5 microtubos de un volumen de 2 mL (previamente secos a 50 °C y pesados). Posteriormente, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga TM22R (Beckman Coulter, E.U.A), se desechó el sobrenadante, se enjuagó con agua destilada estéril y después se almacenaron a 50 °C durante 24 horas en un horno 07065M (ARSA, México). Pasadas 24 horas se cuantificó su peso (Nygaard et al. 2019).

2.5.3. Evaluación del consumo de fuente de carbono

De acuerdo con lo reportado por Saqib y Whitney (2011), la determinación del consumo de fuente de carbono fue evaluada con el ensayo de azúcares reductores (3,5-ácido dinitrosalicílico o DNS). Para ello se prepararon 10 g de DNS con 300 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle) en 800 mL de NaOH (0.5 N) y se calentó para disolver los reactivos. Esta solución se añadió a los sobrenadantes de las muestras obtenidas y se calentó a 96 °C en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) durante 5 min y rápidamente se enfriaron a 2 °C durante 5 min.

La absorbancia de las muestras fue medida en un espectrofotómetro Epoch (BioTek, E. U. A) a 540 nm y los datos fueron analizados a través del Software Gen5.

2.5.4. Cálculo de parámetros cinéticos y de producción

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) fue determinado mediante la ecuación de regresión no lineal aplicada a la fase exponencial del crecimiento (Carlozzi et al. 2020).

$$Y = X_0 \exp^{\mu t}$$

Mientras que el tiempo de duplicación (T_d) fue evaluado como la relación entre el logaritmo natural de 2 (0.693) sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) (Salazar-Magallon et al. 2015).

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En el caso de los rendimientos de producción estos se determinaron mediante las ecuaciones reportadas por Abid et al. (2016), Ghosh et al. (2019) y Pagliano et al. (2017) siendo:

- Rendimiento biomasa sobre sustrato: $Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)}$

donde X_f es la biomasa final generada (g L^{-1}) a 48 horas de fermentación, X_0 la biomasa inicial (g L^{-1}) al comienzo de la fermentación, S_0 la concentración inicial del sustrato (g L^{-1}) y S_f la concentración final del sustrato (g L^{-1}).

- Rendimiento producto sobre sustrato: $Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)}$

donde P_f es la cantidad de producto generado (g L^{-1}) a 48 horas de fermentación, P_0 la cantidad inicial de producto, S_0 la concentración inicial del sustrato (g L^{-1}) y S_f la concentración final del sustrato (g L^{-1}).

- Rendimiento producto sobre biomasa: $Y_{P/X} = \frac{P_{3HB} (\text{g L}^{-1})}{\text{Biomasa celular} (\text{g L}^{-1})}$

Los cálculos de velocidad de consumo de sustrato, velocidad de generación de producto y productividad volumétrica fueron realizados a las 48 horas de acuerdo con las ecuaciones reportadas por Ghosh et al. (2019) y Sangkharak et al. (2020).

- Velocidad de consumo de sustrato: $q_s = \frac{\text{Sustrato consumido (g L}^{-1}\text{)}}{(\text{hra}) \times \text{Biomasa celular (g L}^{-1}\text{)}}$
- Velocidad de generación de producto: $q_p = \frac{\text{P3HB (g L}^{-1}\text{)}}{(\text{hra}) \times \text{Biomasa celular (g L}^{-1}\text{)}}$
- Productividad volumétrica de P3HB: $Q_p = \frac{\text{P3HB (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Tiempo de cultivo (hra)}}$

2.6. Análisis estadísticos

Los parámetros cinéticos y de producción calculados entre los medios de cultivo empleados a todos los niveles de incubación fueron analizados mediante una prueba t de Student, considerando una $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativa. El software SPSSv20 fue usado para realizar este análisis.

3. Resultados

La **Fig. 8** muestra los resultados del crecimiento cinético de *B. cereus* 4N a nivel matraz (0.2 y 1 L) bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A en condiciones óptimas de incubación (30 °C, 150 rpm y pH 6). Estos resultados muestran un comportamiento similar en ambos volúmenes analizados, presentando un mejor desarrollo celular en el medio de cultivo M-A. También, se determinó que en ambos medios de cultivo la fase logarítmica abarca hasta las 24 horas de cultivo, después de ello el cultivo entra a fase estacionaria donde se observa un incremento en el desarrollo celular.

Otra observación son las diferencias en los cambios de pH que ocurren durante el crecimiento de la cepa bacteriana en estudio en ambas formulaciones, puesto que se observa que en el medio de cultivo GRPD la cepa bacteriana presenta acidificación durante las primeras 6 horas de cultivo y después ocurre un efecto de “rebote”, donde el pH del medio de cultivo presenta un aumento de este parámetro. Por otra parte, el desarrollo de *B. cereus* 4N bajo el estímulo del medio de cultivo M-A presenta una mayor acidificación durante las primeras 18 horas de cultivo, posterior a ello comienza la alcalinización del medio de cultivo. Cabe destacar que esta formulación mantiene condiciones ácidas un tiempo más prolongado.

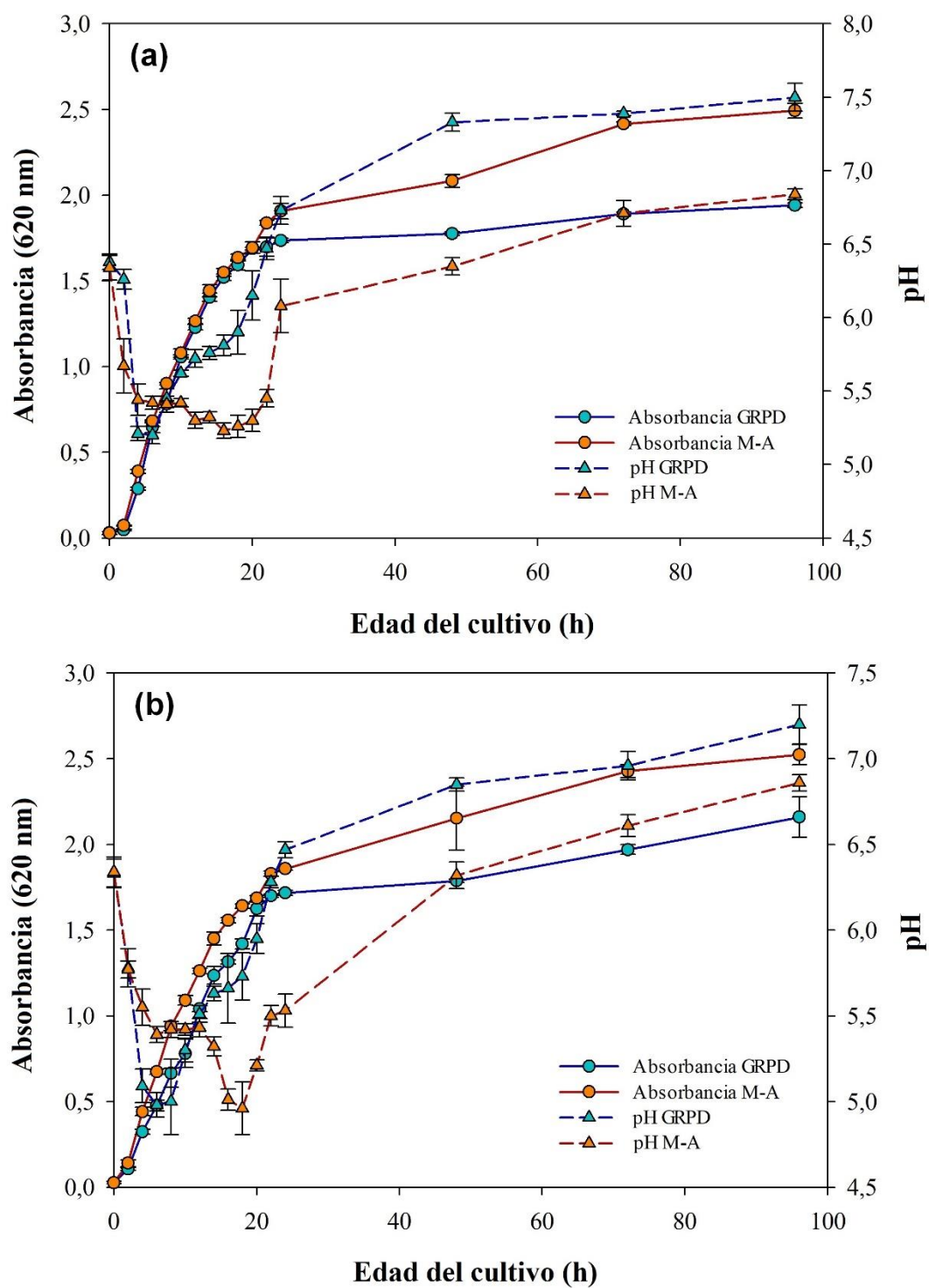


Fig. 8. Comportamiento cinético de *B. cereus* 4N a nivel matraz. **(a)** 0.2 L y **(b)** 1.0 L. Los datos graficados corresponden a la media de tres cinéticas realizadas por triplicado \pm desviación estándar.

De acuerdo con los datos graficados en la **Fig. 9** y **Fig. 10** el medio de cultivo M-A presenta una mayor generación de biomasa celular y producción de P3HB a nivel matraz. Asimismo, como se había observado anteriormente; este medio de cultivo permite la generación de mayores condiciones ácidas durante el crecimiento bacteriano. También, cabe destacar el comportamiento de la generación de biomasa celular en ambos medios de cultivo, ya que como se había determinado previamente en el **Capítulo 2**, esta se incrementa de manera notable a través del tiempo de fermentación, teniendo una máxima producción a las 96 horas de incubación. Otro aspecto que remarcar es la producción de P3HB, puesto que en ambos medios de cultivo se observa que después de las 6 horas de fermentación se presenta un incremento en la biosíntesis de este biopolímero, siendo a la hora 48 cuando se obtiene la mayor producción y posterior a esta hora se presenta una reducción en la concentración de este biopolímero.

En el caso del consumo de la fuente de carbono se indica una importante disminución en la concentración de azúcares reductores después de las 24 horas en el medio GRPD y 12 horas en el medio de cultivo M-A (obsérvese que la concentración de sustrato llega a ser menor que la de biomasa celular después de las horas indicadas), dicho evento genera una menor cantidad de sustrato asimilable para la generación de biomasa celular y la biosíntesis de P3HB. Igualmente, se observan diferencias en las concentraciones iniciales de las fuentes de carbono suplementadas, puesto que el medio de cultivo M-A al ser suplementado con 15 gL^{-1} de jarabe de agave solo 9.6 gL^{-1} son reportados como sustrato inicial. Esto es debido a que este jarabe es un sustrato de composición variable que se constituye principalmente por azúcares simples (en su mayoría fructosa) y el resto son carbohidratos complejos (FOS) y sólidos en suspensión como fibra y ceniza.

En cuanto a la evaluación de los parámetros cinéticos y de producción presentados en la **Tabla 8** se observa un mejor desarrollo celular y productividad cuando es inoculada en el medio de cultivo M-A a nivel matraz. Dicha formulación incrementa la velocidad específica de crecimiento más de tres veces, disminuye el tiempo de duplicación, incrementa la cantidad de biomasa celular y P3HB, aumenta los rendimientos de producción y la productividad volumétrica de este biopolímero. Sin embargo, la velocidad de consumo del sustrato es menor en esta nueva formulación, mostrando una mayor afinidad hacia la glucosa como fuente de carbono.

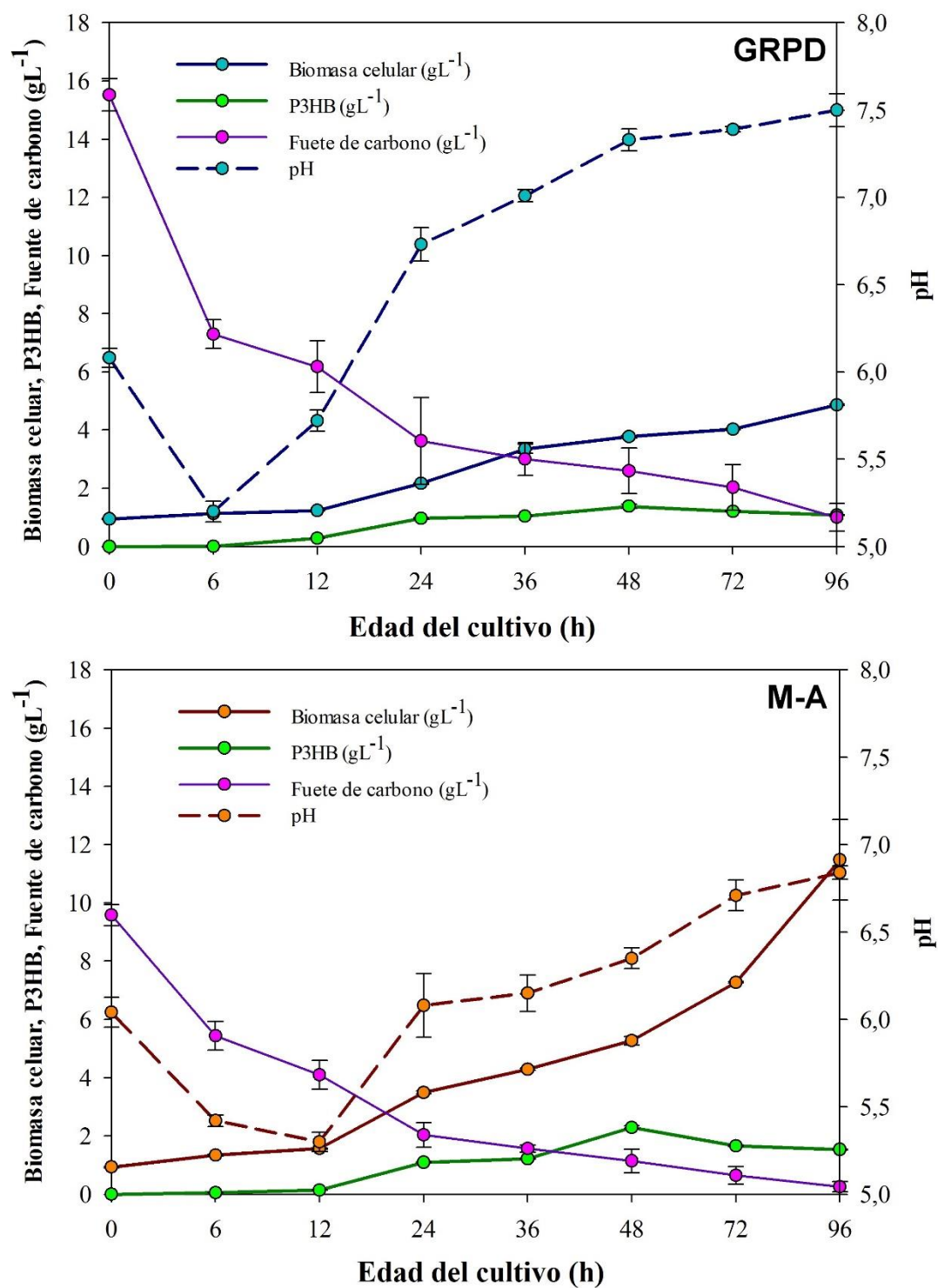


Fig. 9. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}), consumo de fuente de carbono (gL^{-1}) y cambios en pH a nivel matraz (0.2 L). Los datos graficados corresponden a la media de tres cinéticas realizadas por triplicado \pm desviación estándar.

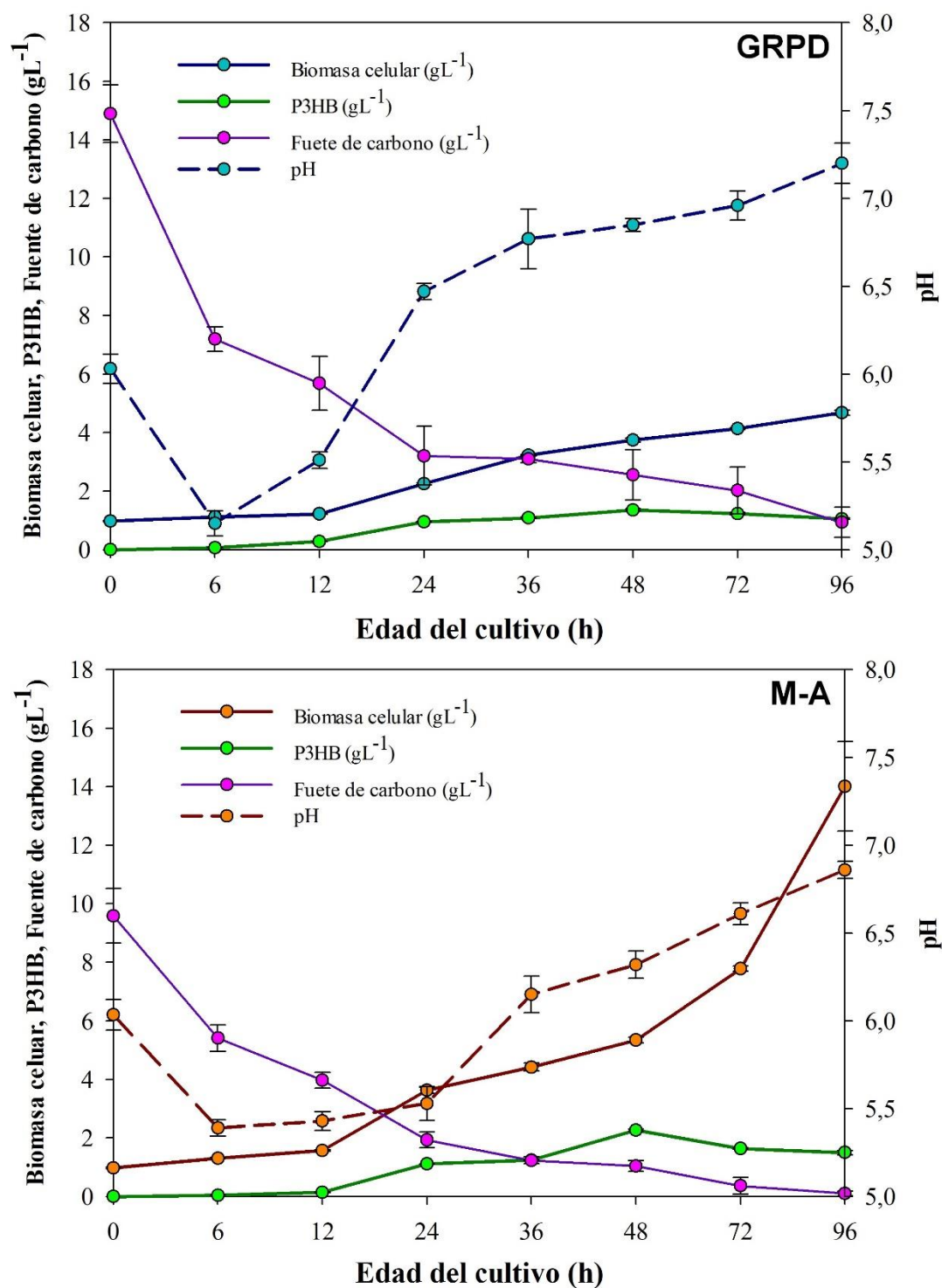


Fig. 10. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL⁻¹), P3HB (gL⁻¹), consumo de fuente de carbono (gL⁻¹) y cambios en pH a nivel matraz (1.0 L). Los datos graficados corresponden a la media de tres cinéticas realizadas por triplicado \pm desviación estándar.

Tabla 8. Parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel matraz.

0.2 L			1.0 L		
Parámetro cinético	GRPD	M-A	Parámetro cinético	GRPD	M-A
μ (h ⁻¹)	0.21 ± 0.02	0.76 ± 0.03	μ (h ⁻¹)	0.26 ± 0.02	0.76 ± 0.04
Td (h)	2.45 ± 0.25	0.91 ± 0.03	Td (h)	2.60 ± 0.26	0.93 ± 0.05
Biomasa celular (gL ⁻¹)	3.77 ± 0.04	5.28 ± 0.15	Biomasa celular (gL ⁻¹)	3.74 ± 0.07	5.34 ± 0.09
P3HB (gL ⁻¹)	1.38 ± 0.07	2.29 ± 0.06	P3HB (gL ⁻¹)	1.36 ± 0.04	2.27 ± 0.04
Y x/s (gg ⁻¹)	0.22 ± 0.02	0.51 ± 0.04	Y x/s (gg ⁻¹)	0.23 ± 0.06	0.55 ± 0.04
Y p/s (gg ⁻¹)	0.11 ± 0.01	0.27 ± 0.01	Y p/s (gg ⁻¹)	0.11 ± 0.05	0.29 ± 0.02
Y p/x (gg ⁻¹)	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.04	Y p/x (gg ⁻¹)	0.36 ± 0.12	0.44 ± 0.01
qs (gg ⁻¹ * h)	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.01	qs (gg ⁻¹ * h)	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.02
qp (gg ⁻¹ * h)	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	qp (gg ⁻¹ * h)	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Qp (gL ⁻¹ * h)	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	Qp (gL ⁻¹ * h)	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.02

*Los datos son representados como la media de los parámetros calculados de tres cinéticas de crecimiento realizadas por triplicado ± desviación estándar bajo la influencia del medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (GRPD) y la formulación diseñada en este estudio compuesta por jarabe de agave y harina de soya (M-A). Los datos obtenidos fueron evaluados entre los medios de cultivo mediante una prueba t de Student ($p \leq 0.05$) (**ANEXO VIII**). μ : velocidad de crecimiento, **Td**: tiempo de duplicación, **Y x/s**: rendimiento biomasa sobre sustrato, **Y p/s**: rendimiento producto sobre sustrato, **Y p/x**: rendimiento producto sobre biomasa, **qs**: velocidad de consumo de sustrato, **qp**: velocidad de generación de producto y **Qp**: productividad volumétrica de P3HB.

Las evaluaciones a nivel biorreactor (10 L) en sistema discontinuo indicaron un mejor desarrollo celular y una mayor acidificación cuando la cepa bacteriana fue incubada en el medio de cultivo M-A. Asimismo, los cambios de pH indican una máxima acidificación a las 6 horas de incubación en el medio GRPD, posteriormente se presenta un incremento en este parámetro hasta llegar a una condición neutra a las 48 horas. En cambio, en el medio de cultivo M-A se presentan condiciones ácidas durante las primeras 18 horas de cultivo, posterior a ello se produce un incremento del pH hasta llegar a una condición ligeramente ácida al término de la fermentación (**Fig. 11**). Por lo tanto, el comportamiento bacteriano presentado en el biorreactor es similar al producido a nivel matraz.

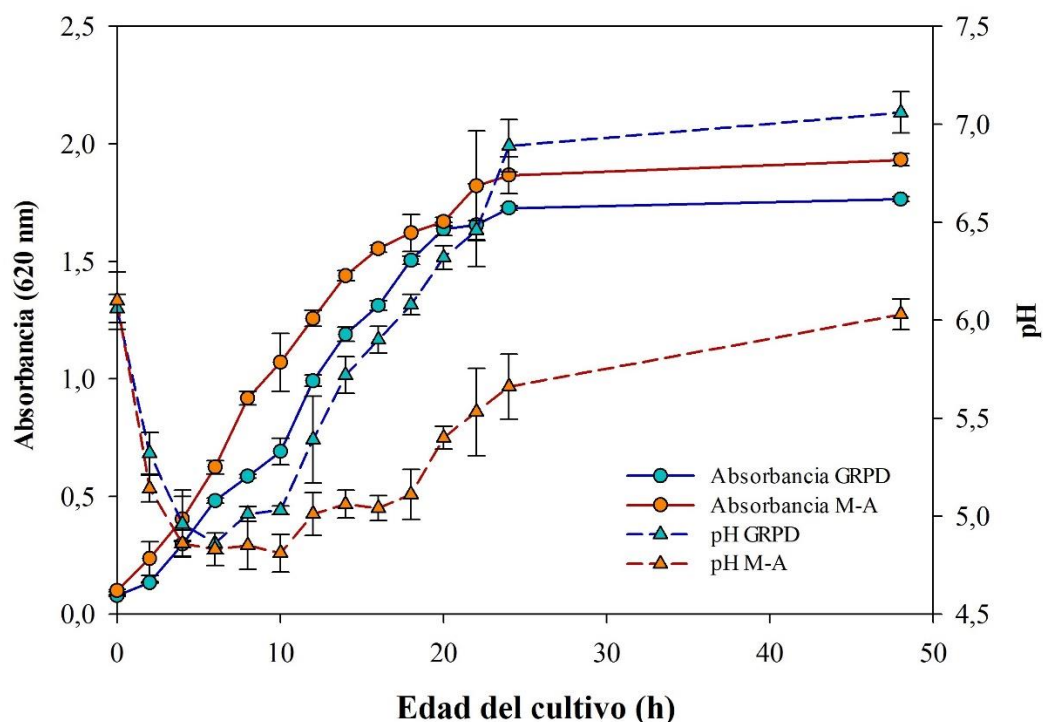


Fig. 11. Comportamiento cinético de *B. cereus* 4N a nivel biorreactor. Los datos graficados corresponden a la media de tres cinéticas realizadas por triplicado \pm desviación estándar.

En cuanto a los datos graficados en la **Fig. 12**, se muestra un comportamiento de generación de biomasa celular y producción de P3HB muy similar a lo presentado a nivel matraz; en los cuales, el medio de cultivo M-A presenta mejores condiciones para la obtención de estos productos. No obstante, los cálculos determinados a partir de las cinéticas de crecimiento obtenidas a nivel biorreactor (**Tabla 9**) indican que a este nivel de incubación se obtiene un aumento en la cantidad de biomasa celular y P3HB. Por igual, los rendimientos de producción, la rapidez de generación del producto y la productividad volumétrica del biopolímero presentan un incremento; sobre todo, cuando la cepa bacteriana *B. cereus* 4N es incubada en el medio de cultivo M-A. Por otra parte, los datos obtenidos sobre las características cinéticas como la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y la velocidad de consumo de sustrato se mantienen de manera semejante a lo obtenido a nivel matraz.

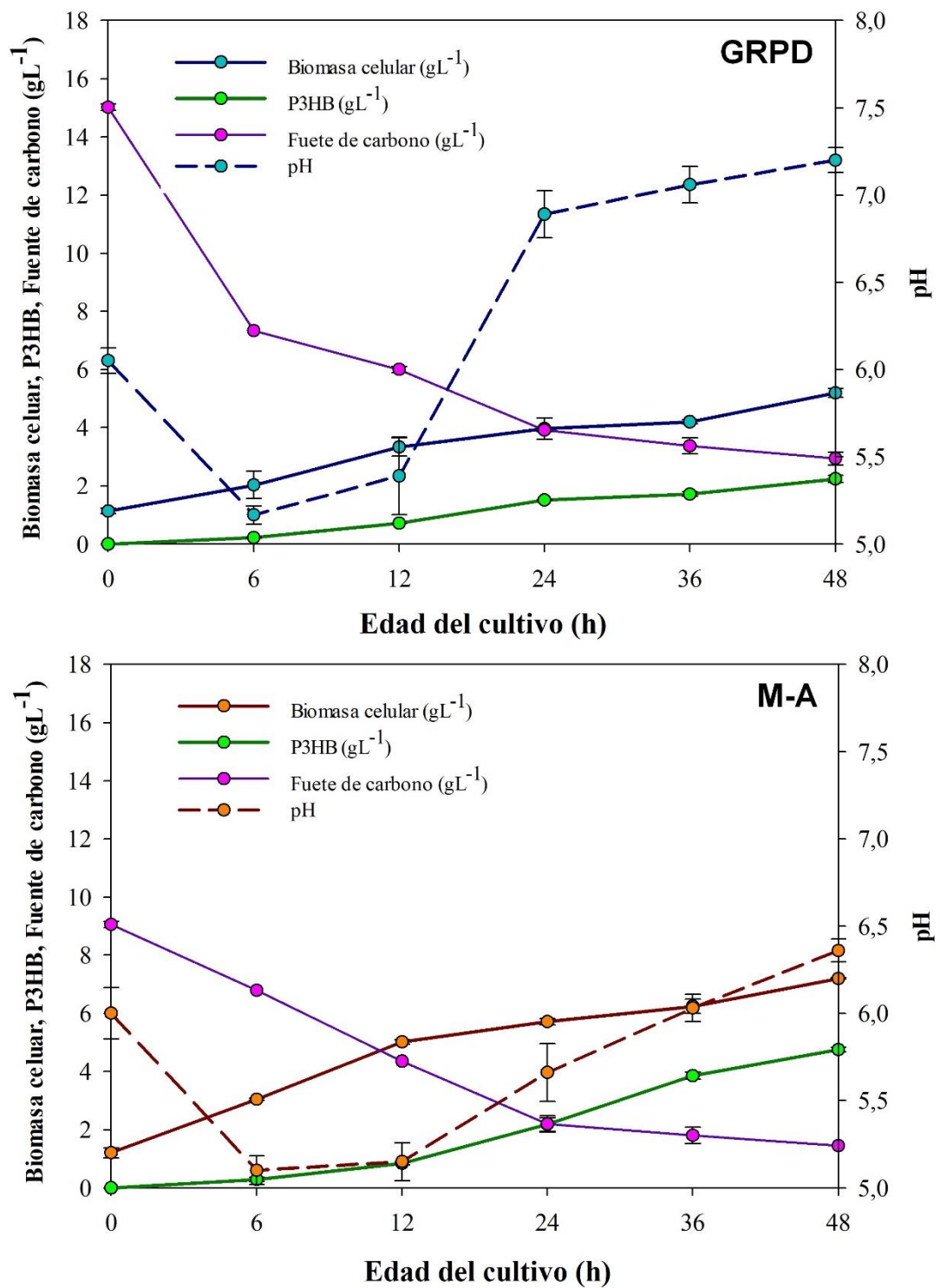


Fig. 12. Evaluación de la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}), consumo de fuente de carbono (gL^{-1}) y cambios en pH a nivel biorreactor (10 L) en sistema discontinuo. Los datos graficados corresponden a la media de tres cinéticas realizadas por triplicado \pm desviación estándar.

Tabla 9. Parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel biorreactor en sistema discontinuo.

10 L		
Parámetro cinético	GRPD	M-A
μ (h ⁻¹)	0.23 ± 0.07	0.74 ± 0.02
Td (h)	2.97 ± 0.10	0.93 ± 0.04
Biomasa celular (gL ⁻¹)	5.19 ± 0.16	7.20 ± 0.03
P3HB (gL ⁻¹)	2.24 ± 0.12	4.75 ± 0.07
Y x/s (gg ⁻¹)	0.28 ± 0.01	0.73 ± 0.03
Y p/s (gg ⁻¹)	0.16 ± 0.01	0.60 ± 0.04
Y p/x (gg ⁻¹)	0.44 ± 0.03	0.66 ± 0.09
qs (gg ⁻¹ * h)	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01
qp (gg ⁻¹ * h)	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Qp (gL ⁻¹ * h)	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.02

*Los datos son representados como la media de los parámetros calculados de tres cinéticas de crecimiento realizadas por triplicado ± desviación estándar bajo la influencia del medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (GRPD) y la formulación diseñada en este estudio compuesta por jarabe de agave y harina de soya (M-A). Los datos obtenidos fueron evaluados entre los medios de cultivo mediante una prueba t de Student ($p \leq 0.05$) (ANEXO IX). μ : velocidad de crecimiento, **Td**: tiempo de duplicación, **Y x/s**: rendimiento biomasa sobre sustrato, **Y p/s**: rendimiento producto sobre sustrato, **Y p/x**: rendimiento producto sobre biomasa, **qs**: velocidad de consumo de sustrato, **qp**: velocidad de generación de producto y **Qp**: productividad volumétrica de P3HB.

4. Discusión

La evaluación cinética del desarrollo celular y su comportamiento fisiológico a través de un proceso de fermentación es otro de los puntos críticos relacionados a la optimización productiva del P3HB. Este tipo de análisis permite posteriores modelamientos matemáticos que posibilitan escalamientos a mayores volúmenes y el estudio de la producción mediante diferentes modos operativos del biorreactor (Das y Grover 2018). En primera instancia, en este estudio se observó que durante el proceso de fermentación con el medio de cultivo M-A a nivel matraz y biorreactor se produjeron condiciones mayormente ácidas en contraste con el crecimiento determinado con el medio de cultivo GRPD. De acuerdo con Aramvash et al. (2015),

el consumo de sustratos ricos en fructosa generan una mayor acidez en comparación con el consumo de otros carbohidratos. Esto se debe a que durante este proceso metabólico se genera una mayor concentración de ácidos orgánicos (especialmente ácido acético, ácido láctico y ácido pirúvico) durante las primeras horas de fermentación con este azúcar (Owen et al. 1991). Otra característica observada es el incremento del pH después de la acidificación (efecto de “rebote”). Dicho proceso fisiológico está relacionado al incremento de compuestos ricos en nitrógeno (principalmente exo-proteínas), los cuales están involucrados en el metabolismo de los sustratos presentes en el medio de cultivo (Kraemer-Schafhalter y Moser 1996).

Las condiciones de pH observadas durante el crecimiento de *B. cereus* 4N en el medio de cultivo M-A parecen presentar un efecto benéfico sobre la producción de biomasa celular y P3HB, puesto que la generación de estos productos es mayor en comparación con el medio de cultivo GRPD. De acuerdo con los reportes de Kumar et al. (2013) y Mohapatra et al. (2017), la mayor desventaja del género *Bacillus* es la formación de esporas, dicho proceso fisiológico está involucrado en una reducción del P3HB acumulado intracelularmente puesto que este proceso está involucrado en un alto desgaste energético de la célula bacteriana. Sin embargo, como se había mencionado anteriormente en el **Capítulo 2**, las condiciones ácidas permiten la inhibición de este proceso, incluso la reducción en la transcripción y actividad de enzimas relacionadas al catabolismo de los gránulos de P3HB. Por lo que se reafirma que el medio de cultivo M-A es propicio para la producción de este biopolímero.

En segunda instancia, las cinéticas realizadas a nivel matraz y biorreactor en ambos medios de cultivo permitieron determinar que el P3HB se empieza a producir después de las 6 horas, teniendo una máxima producción a las 48 horas de incubación; por lo que se puede definir que la biosíntesis de este biopolímero ocurre durante la fase logarítmica y su máxima producción ocurre en la fase estacionaria. Cabe señalar que esta es una cualidad del género *Bacillus*, puesto que este género bacteriano pertenece a la clase de acumuladores bifásicos; es decir, aquellas bacterias que almacenan P3HB en fase logarítmica y estacionaria, dicha característica le permite ser altamente productiva de este biopolímero (Aljuraifani et al. 2018). También, en este estudio se relaciona la máxima acidez (pH 4.58-5.10) producida a las 6 horas de incubación en ambos medios de cultivo con el inicio de la biosíntesis del P3HB. Según los estudios

de Valappil et al. (2007), las condiciones sin control de pH son benéficas para la producción de P3HB con cepas de *Bacillus cereus*, puesto que el inicio de la acumulación intracelular de este biopolímero inicia bajo condiciones altamente ácidas (pH 5.0) que activan a los factores de transcripción σ^N o σ^{54} , los cuales permiten la transcripción de las enzimas relacionadas a la ruta biosintética de los PHAs. Incluso se indica que en el caso de mantener el pH estable durante todo el proceso de fermentación se propicia la disminución de la actividad de estos factores transcripcionales y por ende, se reduce la biosíntesis de este biopolímero (Philip et al. 2009).

En cuanto a los parámetros cinéticos, las cantidades de producto (biomasa y biopolímero), rendimientos de producción y productividad; son mejores con el medio de cultivo M-A, esto en comparación con los parámetros obtenidos con el medio de cultivo GRPD. Sin embargo, la rapidez de consumo de sustrato fue mayor en el medio de cultivo GRPD. Este efecto se debe a que la glucosa como fuente de carbono es rápidamente captada hacia su metabolismo debido a la estructura bioquímica de este carbohidrato, dado que aparte de ser considerada como la fuente de carbono más simple consumida por diversos microorganismos, el grupo aldehído presente en su estructura permite una más fácil captación (Sakthiselvan y Madhumathi 2019). Asimismo, la rapidez del consumo de este sustrato se puede relacionar con el rápido aumento de pH presentado anteriormente, puesto que este es indicativo de un aumento en la presencia de exo-proteínas relacionadas a la adaptación de la bacteria al cultivo y la oxidación de compuestos (Madeira et al. 2015).

En relación con el nivel de cultivo, la cepa bacteriana empleada presentó una mayor generación de productos (biomasa y biopolímero), rendimientos de producción y productividad volumétrica a nivel biorreactor (especialmente en el medio de cultivo M-A), conservando los mismos parámetros cinéticos. Uno de los factores que se adicionaron en esta evaluación, es el efecto de la velocidad de aireación (1 vvm) y la velocidad de las propelas (250 rpm); este último considerado bajo porque la distribución del oxígeno disuelto no es completa en todo el volumen del medio de cultivo, lo cual afecta la distribución de este sustrato. En estudios previos se reporta que estas variables son importantes, ya que se informa que las cepas de *Bacillus cereus* presentan un mejor desarrollo celular y acumulación de P3HB bajo la influencia de

niveles bajos de oxigenación, dichos parámetros propician una condición de equilibrio ideal; puesto que permiten una tasa de crecimiento balanceada donde los recursos son destinados hacia el crecimiento celular y la producción de biopolímero (Philip et al. 2009).

Por su parte, la máxima producción obtenida a nivel biorreactor con *B. cereus* 4N y el medio de cultivo M-A es competente con los datos informados en reportes actuales (**Tabla 10**). Incluso, la producción obtenida es equiparable con la reportada con *B. megaterium* BA-019, una cepa bacteriana considerada como competente a nivel industrial (Kulpreecha et al. 2009). Otro aspecto que considerar es la rapidez con la que las cepas bacterianas del género *Bacillus* presentan una máxima biosíntesis de P3HB, lo cual ocasiona un aumento en la productividad de este biopolímero. Por lo tanto, este género bacteriano es adecuado para el escalamiento de este bioproceso a nivel industrial.

Tabla 10. Resumen comparativo de cepas bacterianas productoras de P3HB.

Parámetro	<i>B. cereus</i> 4N	<i>B. cereus</i> VIT-SSR1	<i>H. mediterranei</i> WT	<i>B. sacchari</i> LFM 101	<i>B. sacchari</i> DSMZ	<i>B. megaterium</i> BA-019
Fuente de carbono	Jarabe de agave	Melaza de caña	Glucosa <i>Ulva sp.</i>	Glucosa Lactosa	<i>A. tequilana</i> hidrolizado	Melaza de caña
Fuente de nitrógeno	Harina de soya	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tryptona	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea
Sistema	Discontinuo	Discontinuo	Discontinuo	Discontinuo	Discontinuo	Discontinuo
Tiempo de fermentación (h)	48	48	72	100	122	40
Biomasa celular (gL ⁻¹)	7.20	3.53	3.80	4.24	11.03	8.78
PHB (gL ⁻¹)	4.75	1.42	2.20	2.07	2.67	5.41
Y x/s (gg ⁻¹)	0.73	-	-	0.45	0.25	-
Y p/s (gg ⁻¹)	0.60	-	-	-	0.10	-
Y p/x (gg ⁻¹)	0.66	0.40	0.58	0.48	0.24	0.62
Qp (gL ⁻¹ *h)	0.10	-	0.04	0.02	-	-
Referencia	Este estudio	(Evangeline y Sridharan 2019)	(Ghosh et al. 2019)	(de Andrade et al. 2019)	(González-García et al. 2019)	(Kulpreecha et al. 2009)

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL BIOPOLÍMERO PRODUCIDO POR *Bacillus cereus* 4N BAJO LA INFLUENCIA DE PARÁMETROS ÓPTIMOS

Resumen

El P3HB es un biopolímero que cada vez atrae más la atención en investigación e industria debido a sus propiedades fisicoquímicas muy similares a la de los plásticos de origen sintético. Por lo que su campo de empleo es cada vez mayor en diversos sectores del desarrollo humano. Pero, antes de dar una utilidad es necesario caracterizar fisicoquímicamente este biomaterial. Por esta razón, el presente capítulo se centró en caracterizar mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM) el biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo condiciones óptimas de cultivo. Los resultados demuestran que el biopolímero extraído es P3HB sin cambios químicos y estructurales, el cual presenta un bajo grado e índice de cristalinidad, menor tamaño de cristal, potencial biodegradable y exhibe una estructura porosa e irregular en su superficie. Por lo tanto, dichas cualidades lo hacen un biomaterial propicio para su empleo en diversos sectores del desarrollo humano.

Palabras clave: *Bacillus* • bioplásticos • cristalinidad • termorresistencia • biodegradabilidad • poli(3-hidroxibutirato)

1. Introducción

El P3HB es un biopolímero que presenta propiedades fisicoquímicas particulares; tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, termoresistencia y aspectos mecánicos que lo hacen adecuado para la manufactura de diversos utensilios y productos destinados al sector agrícola, industrial y médico (Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016).

En agricultura, este biopolímero es empleado para la síntesis de películas protectoras de semillas, redes agrícolas para la protección de cultivos ante plagas e inclemencias del clima, bolsas de cultivo para la cría de plántulas, material compostable para incrementar la fijación de nitrógeno en suelo y la formulación de pesticidas de acción prolongada (Amelia et al. 2019). A nivel industrial, este biomaterial ha sido considerado para la síntesis de empaques biodegradables, contenedores y botellas, coberturas para papel y cartón, fibras para la manufactura de cables y cuerdas, así como la producción de accesorios para la industria electrónica (Masood et al. 2015; Możejko-Ciesielska y Kiewisz 2016). Mientras que, en medicina el P3HB ha llamado la atención debido a sus características biocompatibles que lo hacen apto para la elaboración de diversos utensilios médicos. Dentro de esta rama se encuentra la síntesis de materiales para ingeniería de tejidos, la producción de implantes y la fabricación de conductos. Asimismo, se reporta que este biopolímero ha sido empleado para la síntesis de fármacos de liberación controlada (Koller 2018). La ventaja en este aspecto es que el P3HB no produce carcinogénesis al estar incrustado en tejido vivo durante largos periodos de tratamiento (Junyu et al. 2018). Sin embargo, para poder dar una aplicación al P3HB producido es necesario realizar una serie de estudios composicionales, estructurales, térmicos, cristalinos y morfológicos (Tan et al. 2014).

Por esta razón, el presente capítulo se centró en evaluar las propiedades del biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A con parámetros óptimos de incubación; mediante análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A). Mientras que el jarabe de agave y la harina de soya utilizados como sustratos fueron obtenidos de mercados locales en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.

2.2. Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Medios de cultivo y condiciones de fermentación

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo con los siguientes medios de cultivo:

- GRPD (medio rico en glucosa y deficiente en peptona): Glucosa (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹) (Masood et al. 2017).
- M-A (medio Martínez-Alemán): Jarabe de agave (15.0 gL⁻¹), harina de soya (1.5 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).

Los medios de cultivo fueron ajustados a pH 6.0 con un potenciómetro OrionStar A214 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) y esterilizados a 120 °C, 15 lbp durante 15 min en una autoclave 25x-1 (All American, E. U. A).

Los experimentos de fermentación se realizaron partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la preparación a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, esta fue inoculada con 100 µL (10⁸ UFC mL⁻¹) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y fue incubada con agitación continua en una incubadora MaxQ4000

(Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después, matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma preparación; se inocularon al 2 % (vv⁻¹) con el pre-inóculo fermentado durante 24 horas. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 48 horas.

2.3.1. Extracción de P3HB

El P3HB producido fue recuperado mediante el protocolo de extracción tradicional con NaOCl y cloroformo (Hahn et al. 1994). Para esto se colocaron las muestras en botes de polipropileno y se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A), una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv⁻¹), se homogenizó y se dejó reposar en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) a 30 °C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó, se retiró el sobrenadante y a la pastilla resultante se le añadieron 9 mL de una mezcla de metanol, acetona y dietil éter (1:1:1), se volvió a centrifugar y al obtener la pastilla se le agregaron 10 mL de cloroformo, el cual se llevó a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en cajas Petri de cristal y se dejó secar a 24 °C.

2.4. Caracterización del biopolímero extraído

Para los análisis de caracterización llevados a cabo por FTIR, ¹H-RMN, DSC y XRD se empleó una muestra de P3HB comercial (Sigma-Aldrich, E. U. A) como control.

2.4.1. FTIR

Los grupos funcionales del biopolímero obtenido fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) mediante un espectrofotómetro FTIR Nicolet iS20 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) escaneando en un rango de 500-3500 cm⁻¹, con un barrido de 64 escaneos por muestra y una resolución de 4 cm⁻¹. Los espectros obtenidos fueron analizados con el software OMNICv9.0.

2.4.2. ^1H -RMN

Las propiedades estructurales fueron medidas mediante resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) empleando un espectrofotómetro Eft-90 (Anasazi Instruments, E. U. A). Se empleó el cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia. Para este análisis una muestra de 20 mg fue disuelta en 0.5 mL de CDCl_3 y fue analizada a 90 MHz y temperatura de 25 °C. Los cambios químicos son presentados en la escala δ (ppm) y las multiplicidades son indicadas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), q (cuadruplete) y m (multiplete).

2.4.3. DSC

Las propiedades térmicas del biopolímero fueron analizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando el calorímetro Q2000 (TA Instruments, E. U. A). Muestras de 2-3 mg fueron colocadas en placas de aluminio herméticas y evaluadas en un rango de 25-300 °C, con una velocidad de calentamiento de 5 °C min^{-1} . Las propiedades térmicas evaluadas fueron T_m (temperatura de fusión), ΔH_m (entalpía de fusión), T_c (temperatura de cristalización), T_d (temperatura de degradación) y X_c (grado de cristalinidad). Los termogramas obtenidos y las propiedades térmicas fueron analizadas con el software TA Universal.

El grado de cristalinidad (X_c) fue calculado como la relación entre la entalpía de fusión obtenida (ΔH_m) sobre la entalpía de fusión reportada para P3HB 100% cristalino (ΔH_0): 146 Jg^{-1} (Oliveira et al. 2007).

$$X_c = \left[\frac{(\Delta H_m)}{(\Delta H_0)} \right] * 100$$

2.4.4. XRD

La naturaleza cristalina del biopolímero extraído fue evaluada mediante difracción de rayos X (XRD) empleando el difractómetro Miniflex 600 (RIGAKU, Japón) con una base de Cu $K\alpha$ (40 kV, 40 mA). Cada escaneo fue realizado en un rango de 10-40 °C (ángulo 2-Theta), con velocidades de 3° min^{-1} . La función Gaussiana fue utilizada para normalizar los picos obtenidos y los difractogramas fueron analizados con el software IGOR Prov5.

El índice de cristalinidad (CrI_{P3HB}) y el tamaño del cristal (D_{hkl}) fueron calculados con las fórmulas reportadas por Salgaonkar y Bragança (2017) y Wei et al. (2015).

- Índice de cristalinidad:
$$CrI_{P3HB} = \left[\frac{I_{17}}{I_{Total}} \right] * 100$$

donde I_{17} es la intensidad del pico cercano a $2\text{-Theta} = 17^\circ$ e I_{Total} es la suma de las intensidades de todos los picos característicos del P3HB.

- Tamaño de cristal (fórmula de Scherrer):
$$D_{hkl} = \left[\frac{(K * \lambda)}{(\beta_{1/2} * \theta)} \right]$$

donde K es la constante de la forma del cristal (0.94), λ es la longitud de onda de la radiación de Cu $K\alpha$ (0.1542 nm), $\beta_{1/2}$ es la máxima anchura a mitad de longitud (FWHM) y θ es el ángulo de Bragg del plano (020).

2.4.5. SEM

Las características superficiales del biopolímero extraído fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio SU8020 (HITACHI, Japón) con un voltaje de 5 kV, un flujo de electrones de 4.7 μA y un vacío de 0.3 mBa. Las imágenes tomadas fueron analizadas con el software Image-Pro.

3. Resultados

La **Fig. 13** muestra similitud entre los espectros (FTIR y ^1H -RMN) de la muestra control y los biopolímeros producidos por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo evaluados.

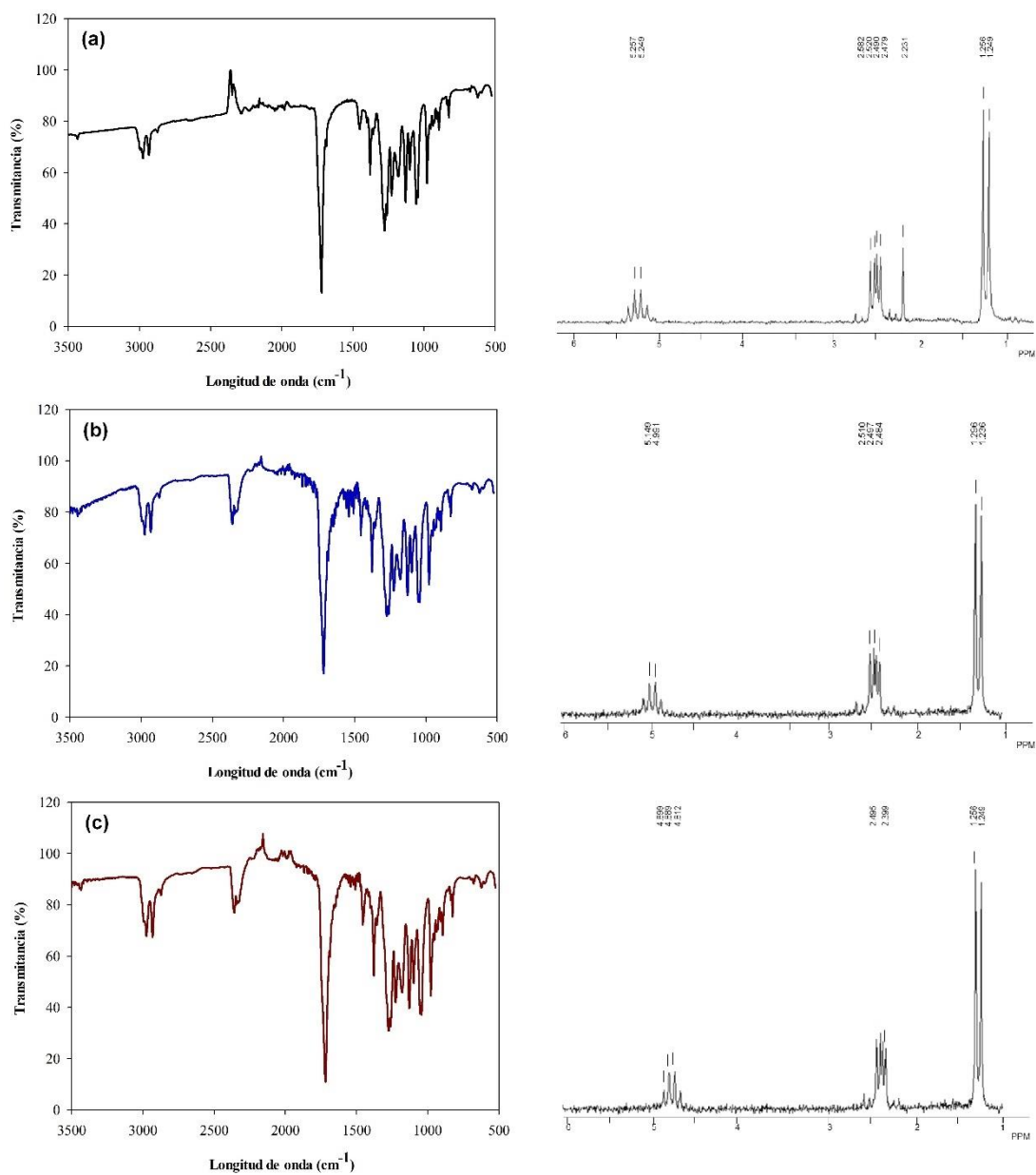


Fig. 13. Espectros FTIR (izquierda) y ^1H -RMN (derecha). **(a)** P3HB comercial (Sigma-Aldrich), **(b)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo GRPD y **(c)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo M-A.

La información presentada en la **Tabla 11** muestra los principales enlaces y compuestos químicos presentes, señalando una composición y estructura química similar entre el P3HB comercial y el biopolímero obtenido.

Tabla 11. Picos espectrales obtenidos por FTIR y ¹H-RMN.

FTIR (Longitudes de onda en cm ⁻¹)			
P3HB (Sigma-Aldrich)	P3HB (GRPD)	P3HB (M-A)	Descripción
2982	2981	2982	Grupos CH ₃ y CH ₂
2360	2365	2365	Enlaces O-H
1725	1720	1720	Enlaces C=O
1468	1460	1465	Deformaciones asimétricas CH ₃
834 – 1378	820 – 1375	820 – 1377	Enlaces C-H Enlaces C-O-C Enlaces C-C-O Enlaces C-CH ₃
¹ H-RMN (Cambios químicos en ppm)			
P3HB (Sigma-Aldrich)	P3HB (GRPD)	P3HB (M-A)	Descripción
1.24, 1.25 (d)	1.23, 1.29 (d)	1.24, 1.25 (d)	Grupos CH ₃
2.23, 2.47, 2.49, 2.52, 2.58 (m)	2.48, 2.49, 2.51 (t)	2.39, 2.49 (d)	Grupos CH ₂
5.24, 5.25 (d)	4.99, 5.14 (d)	4.81, 4.83, 4.88 (t)	Grupos CH

*Multiplicidades de los espectros ¹H-RMN son indicadas como: s (singlete), d (duplete), t (tripleto), q (cuadruplete) y m (multiplete).

Por su parte, los termogramas obtenidos por DSC (**Fig. 14**) muestran un comportamiento similar entre las muestras evaluadas, donde la primera curva representa un cambio en el estado físico y la segunda curva señala la desnaturalización completa de la muestra. Sin embargo, las propiedades térmicas analizadas en la **Tabla 12** muestran diferencias térmicas y cristalinas entre los biopolímeros; siendo la muestra control aquella que presenta la mayor termoresistencia y cristalinidad, mientras que el biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo evaluados presenta propiedades térmicas menores.

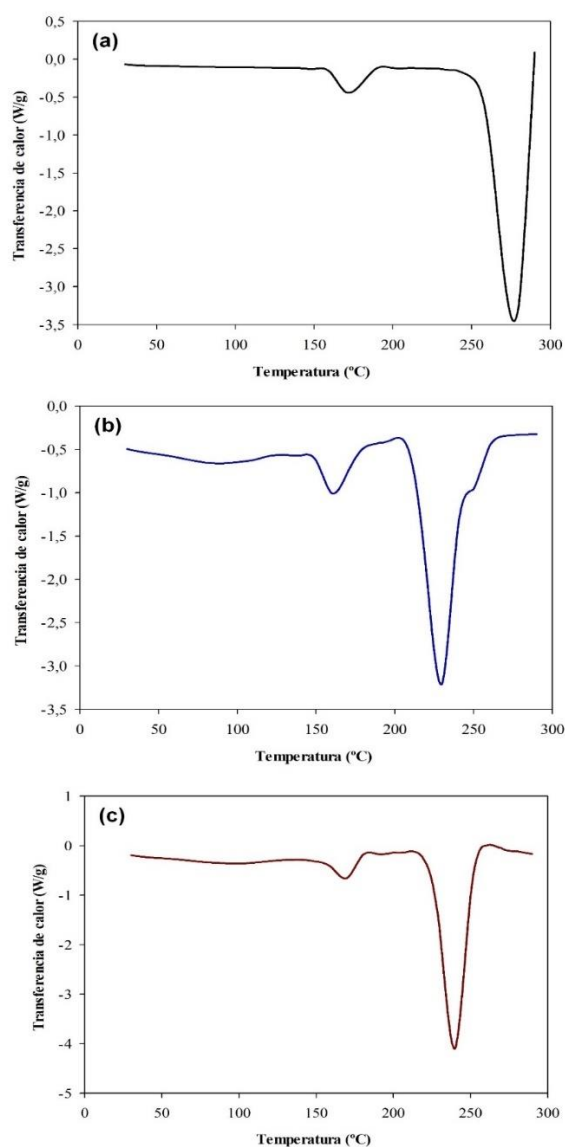


Fig. 14. Termogramas DSC. **(a)** P3HB comercial (Sigma-Aldrich), **(b)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo GRPD y **(c)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo M-A.

Tabla 12. Propiedades térmicas obtenidas por DSC.

Propiedades térmicas					
Muestra	T_m (°C)	ΔH_m (Jg ⁻¹)	T_c (°C)	T_d (°C)	X_c (%)
P3HB (Sigma-Aldrich)	177.41	85.45	165.99	277.28	58.52
P3HB (GRPD)	164.01	37.50	155.76	240.73	25.68
P3HB (M-A)	167.37	35.75	158.43	242.28	24.49

* T_m : Temperatura de fusión, ΔH_m : Entalpía de fusión, T_c : Temperatura de cristalización, T_d : Temperatura de degradación y X_c : Grado de cristalinidad.

En el caso de los difractogramas obtenidos por XRD (**Fig. 15**) se muestra la presencia de 6 picos representados con su respectivo plano, los cuales indican la región cristalina del biopolímero; siendo la muestra control la que presenta una mayor intensidad. Asimismo, las propiedades cristalinas presentadas en la **Tabla 13** indican un mayor índice cristalino y tamaño de cristal en la muestra control mientras que el biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo evaluados presenta propiedades cristalinas menores.

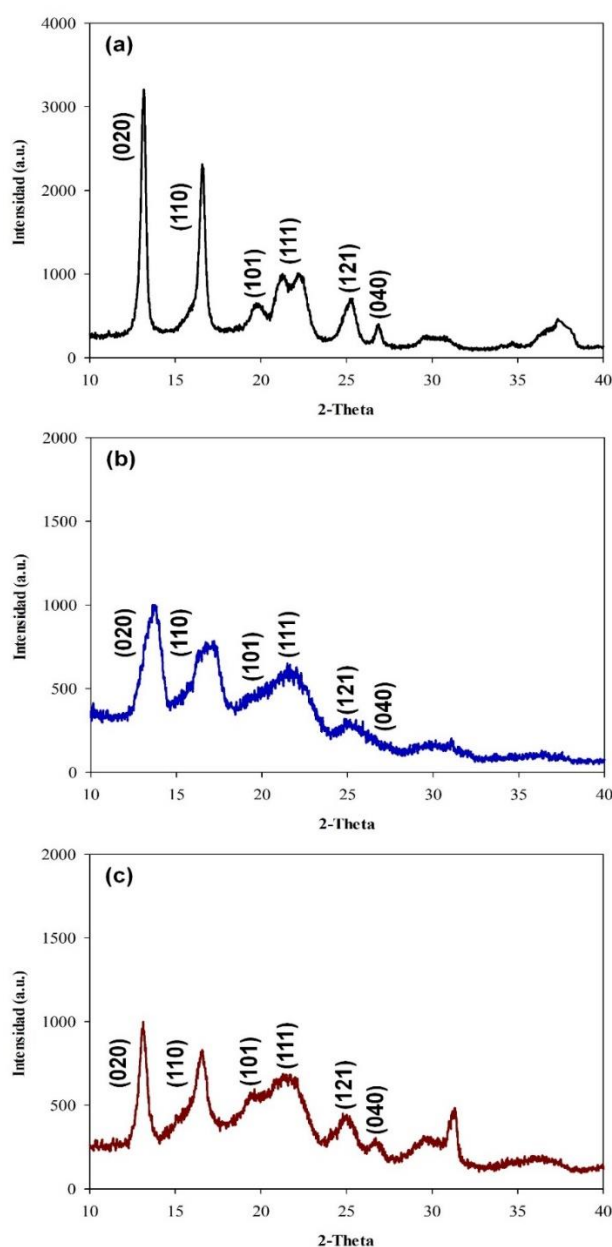


Fig. 15. Difractogramas XRD. **(a)** P3HB comercial (Sigma-Aldrich), **(b)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo GRPD y **(c)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo M-A.

Tabla 13. Propiedades cristalinas obtenidas por XRD.

Propiedades cristalinas								
Muestra	2-Theta e Intensidad (a.u.)						CrI _{P3HB}	D _{hkl} (020) nm
P3HB (Sigma-Aldrich)	13.18° 3153	16.98° 2269	20.21° 615	22.35° 975	25.32° 680	26.98° 334	28.27	22.32
P3HB (GRPD)	13.44° 1000	16.90° 790	21.88° 495	22.34° 636	26.14° 308	27.44° 230	22.84	15.07
P3HB (M-A)	13.20° 1000	16.98° 845	20.90° 603	22.84° 700	25.70° 454	27.82° 307	21.61	14.92

*CrI_{P3HB}: Índice de cristalinidad y D_{hkl} (020): Tamaño de cristal determinado en dirección perpendicular del plano (020).

Por su parte, los análisis morfológicos llevados a cabo por microscopía SEM muestran que la superficie de los biopolímeros producidos por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A presentan una superficie agrietada y porosa (**Fig. 16**).

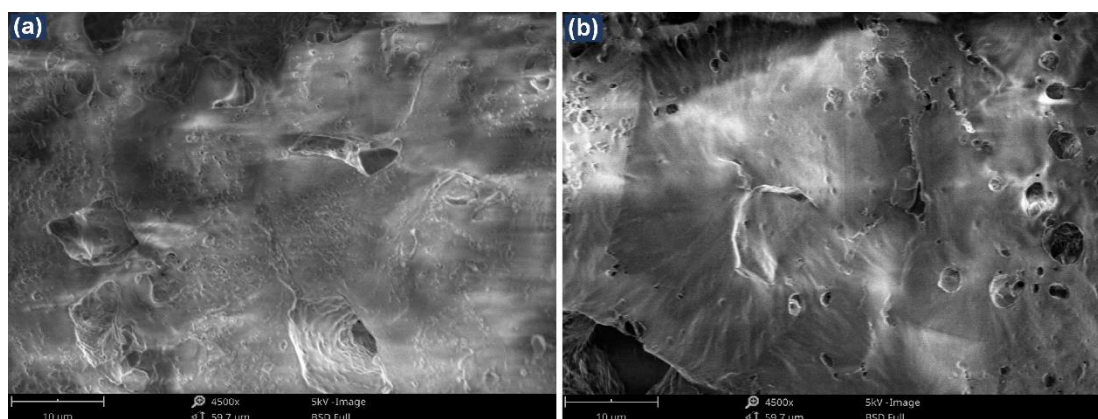


Fig. 16. Microscopia SEM. (a) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo GRPD y (b) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio de cultivo M-A.

4. Discusión

Los espectros FTIR evaluados en este capítulo coinciden con lo reportado por Evangeline y Sridharan (2019), quienes informan que el biopolímero producido por *Bacillus cereus* VIT-SSR1 presenta bandas en 2985 cm^{-1} , las cuales refieren a la presencia de grupos CH_3 y CH_2 e interacciones mediante enlaces alcanos. Asimismo, las bandas a la longitud de 2365 cm^{-1} indican la presencia de enlaces O-H, las bandas intensas presentadas en 1724 cm^{-1} refieren la presencia de enlaces éster carbonilo, las bandas en 1425 cm^{-1} señalan deformaciones de los grupos CH_3 y la huella dactilar presente en la región de $1055\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ representa las regiones cristalinas (C-C-O) y amorfas (C-O-C). De igual forma, el reporte de Masood et al. (2012) indica el espectro del biopolímero producido por *Bacillus cereus* FA11, el cual señala la presencia de bandas en 2950 cm^{-1} que significan la presencia de grupos CH_3 en modo simétrico y CH_2 en modo asimétrico. Así como una banda sobresaliente en 1720 cm^{-1} , la cual corresponde a los enlaces éster carbonilo, aseverándose que la existencia de esta banda por debajo de 1730 cm^{-1} refiere a la naturaleza cristalina de homopolímeros de cadena corta. En el caso de los espectros obtenidos por ^1H -RMN se indica la presencia de picos dobletes entre 1.23 y 1.29 los cuales indican la presencia del grupo metilo ($-\text{CH}_3$), picos multipletes entre 2.39 y 2.58 que refieren a los grupos metileno ($-\text{CH}_2$) y picos dobletes y tripletes entre 4.88 y 5.25 que apuntan la presencia del grupo metino ($-\text{CH}$) (Pradhan et al. 2017). Por lo tanto, los espectros de FTIR y ^1H -RMN indican que el biopolímero obtenido es un homopolímero de P3HB sin cambios estructurales.

En cuanto a las propiedades térmicas del P3HB extraído de *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A son similares a las reportadas por Arumugam et al. (2019), quienes informan que el P3HB producido por *Cupriavidus necator* presenta T_m de $166.9\text{ }^\circ\text{C}$ y T_c de $155.5\text{ }^\circ\text{C}$. Así como a las propiedades térmicas reportadas por Pradhan et al. (2018), quienes informan que el P3HB producido por *Bacillus megaterium* presenta ΔH_m de 33 J g^{-1} y X_c de 23 %. Sin embargo, al contrastar los resultados obtenidos con la muestra control, estos presentan una menor termoresistencia y baja cristalinidad. Aunque es reportado que una baja condición de estas propiedades representa una ventana de oportunidades; debido a que el biopolímero obtenido puede ser moldeado y extruido con mayor facilidad para la generación de accesorios médicos (Özgören et al. 2018).

Los difractogramas XRD del P3HB producido en este estudio muestra la presencia de 6 picos cristalinos cercanos a los ángulos 13° (020), 17° (110), 20° (101), 22° (111), 25° (121) y 27° (040), los cuales han sido reportados como un patrón característico de los biopolímeros tipo P3HB (Babruwad et al. 2015). Estos picos hacen referencia a los cristales ortorrómbicos del P3HB (020 y 110), los cristales α -P3HB (101 y 111) y las regiones cristalinas del biopolímero (121 y 040) (Pradhan et al. 2018; Wei et al. 2015). Asimismo, los índices de cristalinidad confirman el bajo grado de cristalinidad que presenta el P3HB obtenido en este estudio en contraste con el control. Dichos índices son menores a lo reportado por Özgören et al. (2018), quienes informan que *Bacillus marmarensis* produce P3HB con un índice de cristalinidad del 56 %. Cabe destacar que este mismo autor remarca al índice de cristalinidad como un parámetro que representa la capacidad biodegradable del P3HB; ya que un menor índice se correlaciona a una mayor biodegradabilidad, esto debido a que se requiere un menor esfuerzo energético para romper la molécula polimérica. Por lo tanto, el biopolímero obtenido en este estudio es apto para la producción de plásticos biodegradables.

Otra característica evaluada es el tamaño del cristal, ya que el biopolímero obtenido es hasta 7.4 nm menor comparado con el de la muestra control, aunque es reportado por Salgaonkar y Bragança (2017) que los cristales de P3HB pueden llegar a medir hasta 22.3 nm; pero estas características, al igual que las propiedades estructurales, térmicas, cristalinas y morfológicas, pueden variar de acuerdo con la cepa bacteriana empleada, los sustratos usados en el medio de cultivo y el protocolo de extracción.

En cuanto a la morfología superficial de las biopelículas de P3HB producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de los medios de cultivo evaluados, es similar a lo reportado por Bian et al. (2012), quienes informan que las películas producidas por *Bacillus cereus* BMH presentan poros y grietas irregulares que lo hacen un soporte adecuado para la adhesión y el crecimiento celular en cuestiones de ingeniería de tejidos. Por ende, el P3HB producido por la cepa bacteriana *B. cereus* 4N bajo condiciones óptimas de cultivo presenta propiedades como un bajo grado e índice de cristalinidad, potencial biodegradable y morfología propicia para el desarrollo de tejidos. Por lo que este biopolímero puede ser considerado como un biomaterial apropiado para diversas cuestiones en los sectores agrícola, industrial y médico.

CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO ASISTIDO POR ULTRASONIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Resumen

La eficiencia en la producción de P3HB también depende del protocolo de extracción que se utilice. Diversos tipos de extracción que emplean agentes químicos, físicos y biológicos han sido reportados en la literatura. Sin embargo, los que más han destacado son los que utilizan la irradiación con ultrasonido, ya que estos reducen el uso de solventes orgánicos y mejoran las características del P3HB. Por esta razón, el presente capítulo se enfocó en comparar el protocolo tradicional de extracción NaOCl-Cloroformo y una nueva propuesta denominada como US & SFE. Este último protocolo permitió una eficiente recuperación de biopolímero y mejoró las propiedades térmicas, cristalinas y morfológicas del P3HB obtenido. También, en este estudio se observó que al emplear agavinas como una nueva fuente de carbono se obtiene P3HB con mejor estabilidad física; el cual no presenta diferencias en las propiedades evaluadas al ser extraído por ambos protocolos de extracción.

Palabras clave: agavinas • *Bacillus* • biopolímeros • caracterización • ultrasonido

1. Introducción

Actualmente, debido a la importancia que el P3HB ha tenido como un biomaterial de interés en diversas áreas del desarrollo humano, la investigación en torno a este biopolímero (aparte de enfocarse en el proceso de fermentación) se ha dirigido a los protocolos de extracción (Kourmentza et al. 2017). Los procesos de “extracción verde”, aquellos que implican un menor uso de solventes orgánicos e incluso, la sustitución de estos por otros productos renovables han sido tendencia en estos últimos años (Chemat et al. 2012). Diversos tipos de extracción han sido reportados en la literatura, siendo el más común el protocolo de extracción tradicional reportado por Hahn et al. (1994), el cual se basa en la digestión celular con NaOCl y la suspensión del biopolímero en cloroformo. Sin embargo, este protocolo de extracción es tardado e implica el uso de altas cantidades de solventes orgánicos lo cual repercute en la sustentabilidad ecológica del proceso y el precio final del producto (Tan et al. 2014).

Distintas alternativas al protocolo tradicional de NaOCl y cloroformo han sido propuestas; entre estas, el uso de enzimas para la disrupción celular, el empleo de insectos y otros agentes biológicos para digerir biomasa bacteriana, la sustitución de solventes halogenados por agentes surfactantes y el uso de fluidos supercríticos. No obstante, todos estos procesos afectan la pureza del biopolímero recuperado, son operacionalmente lentos y difíciles de reproducir, siguen teniendo cierto grado de toxicidad y son costosos al emplearse a mayor escala (Pérez-Rivero et al. 2019). Por otra parte, el ultrasonido ha sido considerado como un proceso eficiente para la extracción de P3HB; puesto que reduce costos, permite altos rendimientos de recuperación y es considerado ecológico, ya que disminuye el uso de solventes (Ishak et al. 2016; Martínez-Herrera et al. 2020; Pradhan et al. 2017, 2018).

Por esta razón, el presente capítulo se enfocó en evaluar el uso de un nuevo protocolo de extracción asistido por el baño de ultrasonido para extraer el P3HB producido por *B. cereus* 4N bajo distintos parámetros nutricionales. Asimismo, el P3HB extraído fue analizado por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A). El jarabe de agave y la harina de soya empleados como sustratos fueron obtenidos de mercados locales en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México y las agavinas fueron obtenidas de mercados locales en la ciudad de Zapopan, Jalisco, México.

2.2. Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Medios de cultivo, producción de P3HB y protocolos de extracción

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo con los siguientes medios de cultivo:

- GRPD (medio rico en glucosa y deficiente en peptona): Glucosa (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹) (Masood et al. 2017).
- M-A (medio Martínez-Alemán): Jarabe de agave (15.0 gL⁻¹), harina de soya (1.5 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).
- Medio Agavinas: agavinas (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).

Los medios de cultivo fueron ajustados a pH 6.0 con un potenciómetro OrionStar A214 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) y esterilizados a 120 °C, 15 lbp durante 15 min en una autoclave 25x-1 (All American, E. U. A).

Los procesos de fermentación fueron llevados a cabo partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la preparación a evaluar (pre-

inóculo). Posteriormente, esta fue inoculada con 100 μL (10^8 UFC mL^{-1}) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y fue incubada con agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma preparación; se inocularon al 2 % (vv^{-1}) con el pre-inóculo fermentado durante 24 horas. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 48 horas.

2.3.1. Extracción de P3HB

El P3HB producido fue recuperado mediante dos protocolos de extracción:

- NaOCl-Cloroformo (Hahn et al. 1994): Se colocaron las muestras en botes de polipropileno, estos se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A); una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv^{-1}), se homogenizo y se reposo en un baño metabólico DB117615 (Thermoline Scientific, Australia) a 30 °C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugo, se retiró el sobrenadante y a la pastilla resultante se le añadieron 9 mL de una mezcla de metanol, acetona y dietil éter (1:1:1), se volvió a centrifugar y al obtener la pastilla se le añadieron 10 mL de cloroformo; el cual se llevó a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en cajas Petri de cristal y se dejó secar a 24 °C.
- US & SFE (Método de extracción con ultrasonido y libre se solventes): Se colocaron las muestras en botes de polipropileno, estos se centrifugaron a 4 °C, 8000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga J251 (Beckman Coulter, E.U.A); una vez obtenido el paquete celular se le añadieron 15 mL de NaOCl al 10 % (vv^{-1}), se homogenizo y se reposo a 20 °C durante 30 min en un baño de ultrasonido 5510R-MT (Branson, E.U.A) con una potencia de 42 kHz y 132 W. La materia digerida fue centrifugada, lavada con agua destilada y centrifugada de nuevo. Posteriormente, a la pastilla obtenida se le añadieron 10 mL de cloroformo; el cual se llevó a ebullición durante 1 min. El extracto obtenido se colocó en cajas Petri de cristal y se dejó secar a 24 °C.

2.3.2. Cuantificación de biomasa celular y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB)

A partir de los caldos de fermentación se tomaron muestras de 10 mL de medio de cultivo y se distribuyeron en 5 microtubos de un volumen de 2 mL (previamente secos a 50 °C y pesados). Posteriormente, los microtubos fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga TM22R (Beckman Coulter, E.U.A), se desechó el sobrenadante, se enjuagó con agua destilada estéril y después se almacenaron a 50 °C durante 24 horas en un horno 07065M (ARSA, México). Pasadas 24 horas se cuantifico su peso (Nygaard et al. 2019).

El cálculo del porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB) fue determinado como la relación existente entre la cantidad de P3HB producido sobre la cantidad de biomasa celular generada (Pagliano et al. 2017), mediante la siguiente fórmula:

$$\%P3HB = \left[\frac{P3HB \text{ (gL}^{-1}\text{)}}{Biomasa \text{ celular (gL}^{-1}\text{)}} \right] * 100$$

2.4. Caracterización del biopolímero extraído

2.4.1. FTIR

Los grupos funcionales de los extractos poliméricos obtenido fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) mediante un espectrofotómetro FTIR Nicolet iS20 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) escaneando en un rango de 500-3500 cm⁻¹, con un barrido de 64 escaneos por muestra y una resolución de 4 cm⁻¹. Los espectros obtenidos fueron analizados con el software OMNICv9.0.

2.4.2. ¹H-RMN

Las propiedades estructurales fueron medidas mediante resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) empleando un espectrofotómetro Eft-90 (Anasazi Instruments, E. U. A). Se empleo el cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia. Para este análisis una muestra de 20 mg fue disuelta en 0.5 mL de CDCl₃ y fue analizada a 90 MHz y temperatura de 25 °C. Los cambios químicos son presentados en la escala δ (ppm) y las multiplicidades son indicadas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), q (cuadruplete) y m (multiplete).

2.4.3. DSC

Las propiedades térmicas de los biopolímeros obtenidos fueron analizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando el calorímetro Q2000 (TA Instruments, E. U. A). Muestras de 2-3 mg fueron colocadas en placas de aluminio herméticas y evaluadas en un rango de 25-300 °C, con una velocidad de calentamiento de 5 °C min⁻¹. Las propiedades térmicas evaluadas fueron T_m (temperatura de fusión), ΔH_m (entalpía de fusión), T_c (temperatura de cristalización), T_d (temperatura de degradación) y X_c (grado de cristalinidad). Los termogramas obtenidos y las propiedades térmicas fueron analizadas con el software TA Universal.

El grado de cristalinidad (X_c) fue calculado como la relación entre la entalpía de fusión obtenida (ΔH_m) sobre la entalpía de fusión reportada para P3HB 100% cristalino (ΔH_0): 146 Jg⁻¹ (Oliveira et al. 2007).

$$X_c = \left[\frac{(\Delta H_m)}{(\Delta H_0)} \right] * 100$$

2.4.4. XRD

La naturaleza cristalina de los extractos obtenidos fue evaluada mediante difracción de rayos X (XRD) empleando el difractómetro Miniflex 600 (RIGAKU, Japón) con una base de Cu K α (40 kV, 40 mA). Cada escaneo fue realizado en un rango de 10-40 °C (ángulo 2-Theta), con velocidades de 3° min⁻¹. La función Gaussiana fue utilizada para normalizar los picos obtenidos y los difractogramas fueron analizados con el software IGOR Prov5.

El índice de cristalinidad (CrI_{P3HB}) y el tamaño del cristal (D_{hkl}) fueron calculados con las fórmulas reportadas por Salgaonkar y Bragança (2017) y Wei et al. (2015).

- Índice de cristalinidad: $CrI_{P3HB} = \left[\frac{(I_{17})}{(I_{Total})} \right] * 100$

donde I_{17} es la intensidad del pico cercano a 2-Theta = 17 ° e I_{Total} es la suma de las intensidades de todos los picos característicos del P3HB.

- Tamaño de cristal (fórmula de Scherrer): $D_{hkl} = \left[\frac{(K * \lambda)}{(\beta_{1/2} * \theta)} \right]$

donde K es la constante de la forma del cristal (0.94), λ es la longitud de onda de la radiación de Cu K α (0.1542 nm), $\beta_{1/2}$ es la máxima anchura a mitad de longitud (FWHM) y θ es el ángulo de Bragg del plano (020).

2.4.5. SEM

Las características superficiales del biopolímero extraído fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio SU8020 (HITACHI, Japón) con un voltaje de 5 kV, un flujo de electrones de 4.7 μ A y un vacío de 0.3 mBa. Las imágenes tomadas fueron analizadas con el software Image-Pro.

2.5. Análisis estadísticos

Los procesos de fermentación fueron realizados por triplicado. Los datos de generación de biomasa celular, producción de P3HB y %P3HB fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba posterior de Tukey. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa. El software SPSSv20 fue usado para realizar estos análisis.

3. Resultados

La **Tabla 14** muestra la asimilación de medios de cultivo suplementados con carbohidratos simples y complejos, observándose diferencias estadísticas en el desarrollo celular y la producción de P3HB. Asimismo, se encontró una mejor recuperación de este biopolímero con el protocolo US & SFE (notándose un incremento de 0.17-0.64 gL⁻¹ en la cantidad de P3HB extraído), lo cual repercutió en un aumento del %P3HB de 12.89% en el medio de cultivo M-A, 6.55% en el medio Agavinas y 4.31% en el medio de cultivo GRPD.

Tabla 14. Efecto de distintos medios de cultivo y protocolos de extracción.

Medio de cultivo	Protocolo de extracción	Biomasa celular (gL ⁻¹)	P3HB (gL ⁻¹)	%P3HB
GRPD	NaOCl-Cloroformo	3.75 ^b ± 0.03	1.35 ^d ± 0.03	36.13 ^d ± 1.44
	US & SFE	3.76 ^b ± 0.12	1.52 ^c ± 0.02	40.44 ^c ± 1.67
M-A	NaOCl-Cloroformo	5.31 ^a ± 0.22	2.32 ^b ± 0.04	43.70 ^b ± 2.44
	US & SFE	5.25 ^a ± 0.15	2.96 ^a ± 0.09	56.39 ^a ± 2.59
Agavinas	NaOCl-Cloroformo	2.57 ^c ± 0.15	0.50 ^f ± 0.02	19.30 ^f ± 0.77
	US & SFE	2.57 ^c ± 0.08	0.67 ^e ± 0.01	25.85 ^e ± 0.28

*Los datos son representados como la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los grupos de homogeneidad (a-e) fueron determinados mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (**ANEXO X**). **NaOCl-Cloroformo:** protocolo de extracción tradicional basado en digestión con hipoclorito de sodio y suspensión en cloroformo y **US & SFE:** protocolo de extracción con ultrasonido y libre de solventes.

En cuanto a los espectros FTIR y ¹H-RMN de los biopolímeros obtenidos (**Fig. 17**) se muestra una composición y estructura química similar entre todos los extractos producidos bajo la influencia de los medios de cultivo evaluados y obtenidos con ambos protocolos de extracción. Dichas características se reafirman en la **Tabla 15**, en la cual se muestran los grupos químicos que constituyen a este biomaterial. Por lo que se observa que la cepa *B. cereus* 4N bajo la influencia de azúcares simples y complejos produce homopolímeros de P3HB; el cual, al ser recuperado con distintos protocolos de extracción no muestra degradación o modificación en su composición y estructura química.

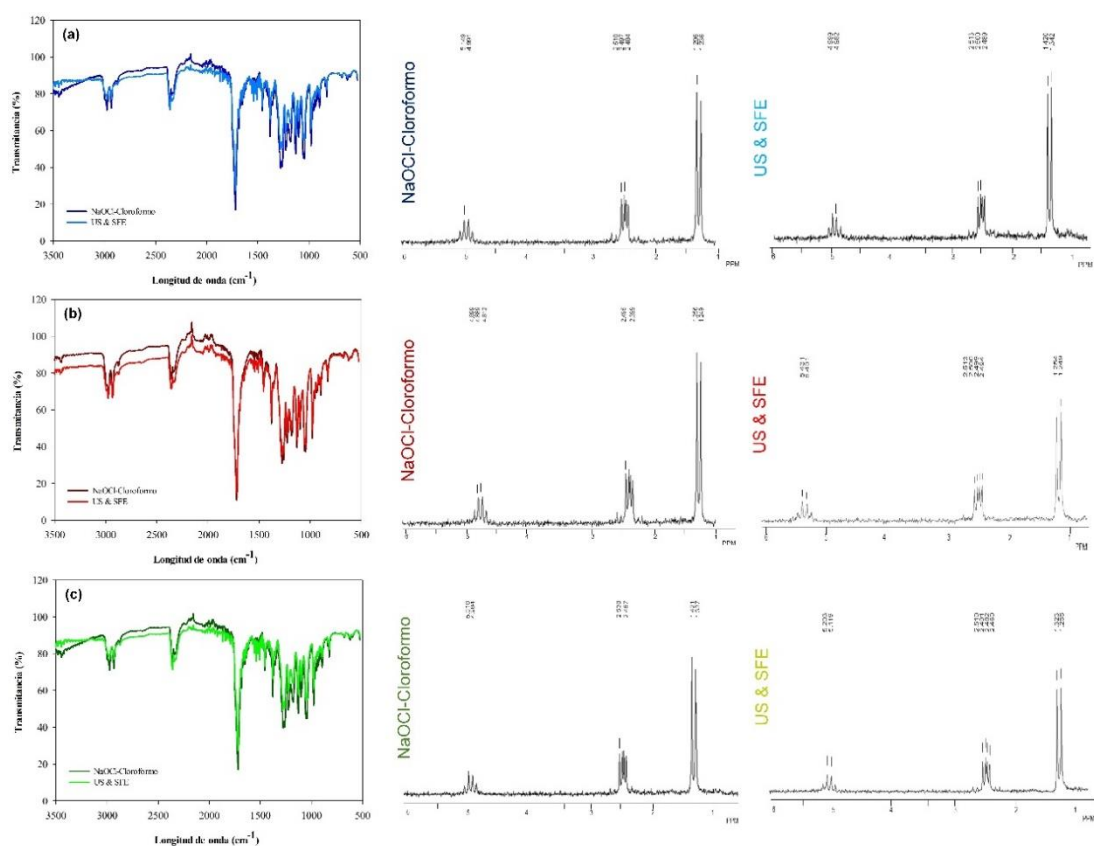


Fig. 17. Espectros FTIR (izquierda) y ¹H-RMN (derecha). **(a)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio GRPD, **(b)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio M-A y **(c)** biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio Agavinas. Los biopolímeros producidos fueron extraídos con los protocolos NaOCl-Cloroformo y US & SFE.

Tabla 15. Picos espectrales obtenidos por FTIR y ¹H-RMN.

FTIR (Longitudes de onda en cm ⁻¹)						Descripción
P3HB (GRPD)		P3HB (M-A)		P3HB (Agavinas)		
NaOCl- Cloroformo	US & SFE	NaOCl- Cloroformo	US & SFE	NaOCl- Cloroformo	US & SFE	
2981	2972	2982	2971	2980	2974	Grupos CH ₃ y CH ₂
2365	2363	2365	2361	2362	2365	Enlaces O-H
1720	1725	1720	1726	1720	1724	Enlaces C=O
1460	1460	1465	1463	1463	1460	Deformaciones asimétricas CH ₃
820–1375	824–1370	820–1377	824–1372	820–1374	816–1369	Enlaces C-H Enlaces C-O-C Enlaces C-C-O Enlaces C-CH ₃
¹ H-RMN (Cambios químicos en ppm)						Descripción
P3HB (GRPD)		P3HB (M-A)		P3HB (Agavinas)		
NaOCl- Cloroformo	US & SFE	NaOCl- Cloroformo	US & SFE	NaOCl- Cloroformo	US & SFE	
1.24, 1.25 (d)	1.34, 1.42 (d)	1.23, 1.29 (d)	1.24, 1.25 (d)	1.24, 1.25 (d)	1.26, 1.32 (d)	Grupos CH ₃
2.23, 2.47, 2.49, 2.52. 2.58 (m)	2.48, 2.50, 2.51 (t)	2.48, 2.49, 2.51 (t)	2.49, 2.49, 2.50, 2.51 (c)	2.39, 2.49 (d)	2.46, 2.48, 2.49, 2.51 (c)	Grupos CH ₂
5.24, 5.25 (d)	4.98, 4.99 (d)	4.99, 5.14 (d)	5.40, 5.43 (2)	4.81, 4.83, 4.88 (t)	5.11, 5.20 (d)	Grupos CH

*Multiplicidades de los espectros ¹H-RMN son indicadas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), q (cuadruplete) y m (multiplete).

Los termogramas obtenidos por el análisis de DSC (**Fig. 18**) muestran un comportamiento similar al obtenido con el P3HB comercial (Sigma-Aldrich) referido en el **Capítulo 4**. No obstante, las propiedades térmicas (ΔH_m , T_d y X_c) difieren entre los producidos bajo la influencia de carbohidratos simples (GRPD y M-A) y complejos (agavinas), así como el protocolo de extracción empleado. Cabe señalar que el biopolímero producido en el medio Agavinas no presentó diferencias térmicas al ser extraído con ambos protocolos de extracción. Asimismo, la T_m y T_c de todos los biopolímeros extraídos no presentan cambios a pesar de la influencia del medio de cultivo y el protocolo de extracción (**Tabla 16**).

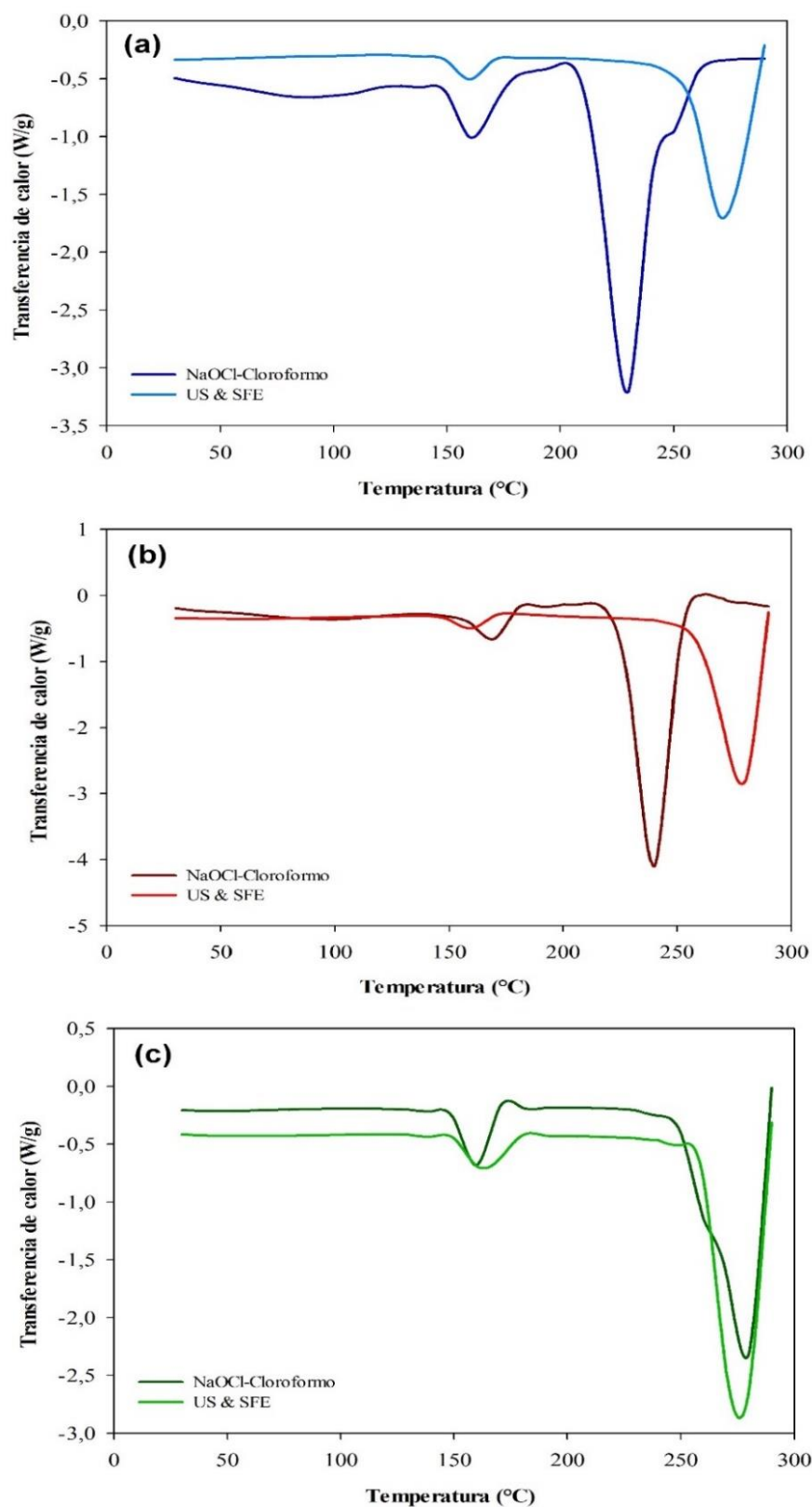


Fig. 18. Termogramas DSC. (a) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio GRPD, (b) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio M-A y (c) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio Agavinas. Los biopolímeros producidos fueron extraídos con los protocolos NaOCl-Chloroform y US & SFE.

Tabla 16. Propiedades térmicas obtenidas por DSC.

Propiedades térmicas (DSC)						
Muestra	Protocolo de extracción	T_m (°C)	ΔH_m (Jg ⁻¹)	T_c (°C)	T_d (°C)	X_c (%)
PHB (M-A)	NaOCl- Cloroformo	167.37	35.75	158.43	242.28	24.49
	US & SFE	167.77	50.94	158.67	268.88	34.89
PHB (GRPD)	NaOCl- Cloroformo	164.01	37.50	155.76	240.73	25.68
	US & SFE	165.91	48.52	155.58	263.67	33.23
PHB (Agavinas)	NaOCl- Cloroformo	167.97	44.72	154.85	261.78	30.63
	US & SFE	168.05	44.85	155.18	262.85	30.72

* T_m : Temperatura de fusión, ΔH_m : Entalpía de fusión, T_c : Temperatura de cristalización, T_d : Temperatura de degradación y X_c : Grado de cristalinidad.

Todos los difractogramas obtenidos por el análisis de XRD (**Fig. 19**) muestran la presencia de los 6 picos característicos del P3HB. Sin embargo, se observan diferentes intensidades entre los biopolímeros obtenidos bajo la influencia de carbohidratos simples y complejos, incluso se observa una mayor intensidad cuando el protocolo US & SFE es empleado para el proceso de extracción. Por otra parte, se muestra un comportamiento particular en los difractogramas del P3HB producido bajo la influencia del medio Agavinas, los cuales muestran los 6 picos característicos, pero al aplicar ambos métodos de extracción parece no tener una amplia diferencia en sus intensidades.

La información presentada en la **Tabla 17** muestra que los índices de cristalinidad son ligeramente mayores al emplear el protocolo US & SFE. Adicionalmente, se observan distintos tamaños de cristal al comparar el biopolímero producido en los medios de cultivo adicionados con azúcares simples y complejos, así como la influencia del protocolo de extracción; ya que al emplear el protocolo NaOCl-Cloroformo se reduce el tamaño de esta estructura. Por otro lado, el tamaño de cristal generado bajo la influencia del medio Agavinas parece no tener una amplia diferencia cuando ambos protocolos de extracción son empleados.

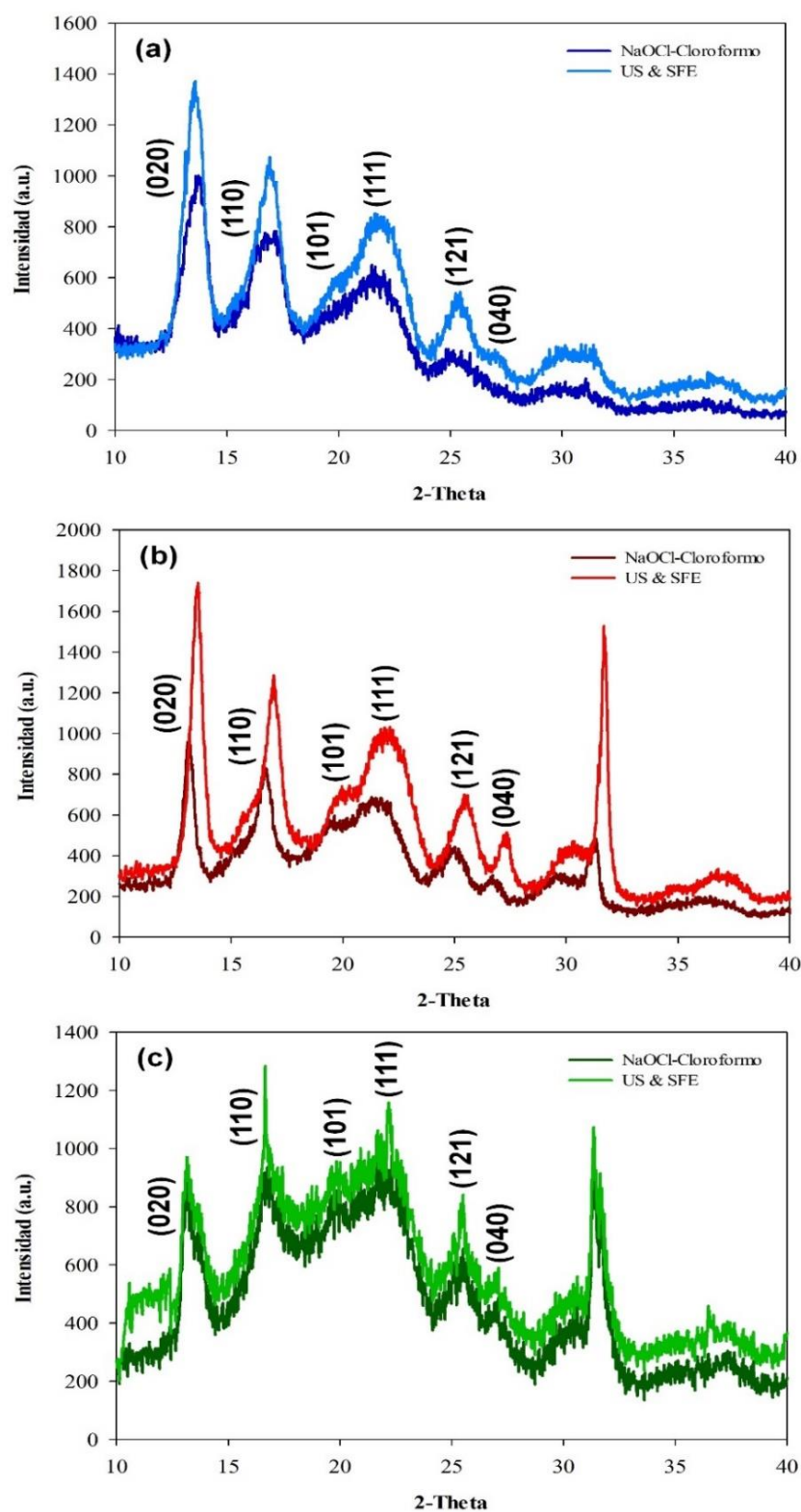


Fig. 19. Difractogramas XRD. (a) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio GRPD, (b) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio M-A y (c) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio Agavinas. Los biopolímeros producidos fueron extraídos con los protocolos NaOCl-Chloroformo y US & SFE.

Tabla 17. Propiedades cristalinas obtenidas por XRD.

Propiedades cristalinas (XRD)									
Muestra	Protocolo de extracción	2-Theta e Intensidad (a.u.)						CrI _{PHB}	D _{hkl} (020) nm
PHB (M-A)	NaOCl-Cloroformo	13.20° 1000	16.98° 845	20.90° 603	22.84° 700	25.70° 454	27.82° 307	21.61	14.92
	US & SFE	13.52° 1710	16.90° 1301	20.98° 690	22.96° 1018	26.04° 607	27.76° 480	22.41	21.43
PHB (GRPD)	NaOCl-Cloroformo	13.44° 1000	16.90° 790	21.88° 495	22.34° 636	26.14° 308	27.44° 230	22.84	15.07
	US & SFE	13.66° 1377	16.96° 1100	21.96° 560	22.52° 820	26.88° 535	27.76° 310	23.39	22.89
PHB (Agavinas)	NaOCl-Cloroformo	13.20° 890	16.90° 945	20.82° 850	22.36° 900	25.66° 654	27.93° 480	20.03	18.72
	US & SFE	13.19° 983	16.97° 1284	20.88° 965	22.40° 1100	25.70° 848	27.82° 595	22.23	19.25

*CrI_{PHB}: Índice de cristalinidad y D_{hkl} (020): Tamaño de cristal determinado en dirección perpendicular del plano (020).

En relación con la morfología superficial que el P3HB presentó al ser recuperado con ambos protocolos de extracción (**Fig. 20**), se mostró que este biopolímero presenta una superficie irregular con grietas y poros. Pero, cuando se aplica el US & SFE se muestra una superficie con mayor irregularidad y porosidad.

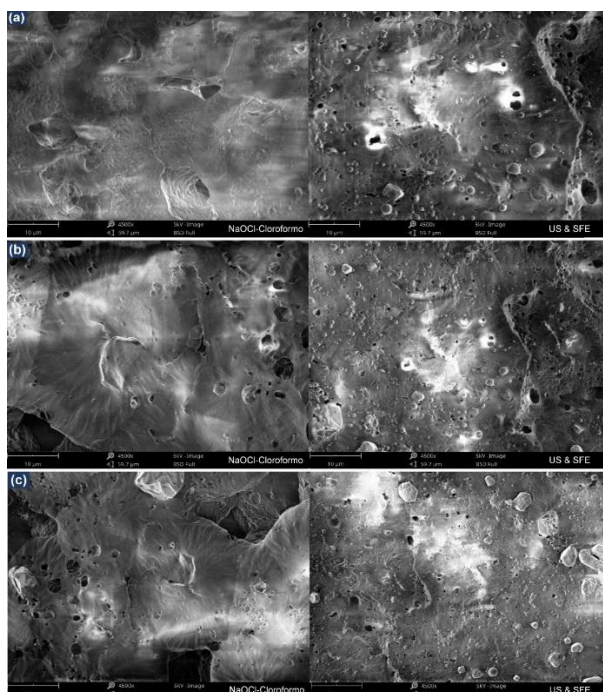


Fig. 20. Microscopía SEM. (a) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio GRPD, (b) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio M-A y (c) biopolímero producido por *B. cereus* 4N en el medio Agavinas. Los biopolímeros producidos fueron extraídos con los protocolos NaOCl-Cloroformo y US & SFE.

4. Discusión

El protocolo US & SFE permitió un incremento en la recuperación del P3HB producido por la cepa bacteriana en estudio bajo la influencia de todos los medios de cultivo evaluados. Este nuevo protocolo de extracción es rápido en comparación con el protocolo tradicional NaOCl-Cloroformo puesto que reduce la digestión con NaOCl y elimina la purificación con solventes orgánicos. De acuerdo con Pradhan et al. (2018) e Ishak et al. (2016), el uso de la irradiación con ultrasonido reduce la digestión celular con NaOCl, el empleo de solventes orgánicos que pueden provocar contaminación en el P3HB y disminuye el número de pasos metodológicos que provocan pérdidas durante el proceso de extracción.

Los análisis por FTIR y ^1H -RMN demuestran que el P3HB recuperado no presenta alteraciones químicas al ser producido en cualquiera de los medios de cultivo evaluados y al emplear ambos protocolos para su extracción. Esto debido a que los espectros muestran uniformidad con los picos reportados como característicos de este biopolímero (Hernández-Núñez et al. 2019; Pradhan et al. 2018). Sin embargo, los análisis térmicos realizados por DSC muestran diferencias en los extractos producidos bajo la influencia de los medios de cultivo suplementados con carbohidratos simples (GRPD y M-A) y recuperados por ambos protocolos de extracción. Puesto que el P3HB biosintetizado bajo este parámetro nutricional y extraído con el protocolo US & SFE, muestra un incremento en su resistencia térmica y grado de cristalinidad. Por otro lado, el biopolímero producido en el medio de cultivo adicionado con azúcares complejos (medio Agavinas) no muestra cambios en su termoresistencia y grado de cristalinidad al ser extraído por ambos protocolos de extracción.

De acuerdo con los estudios de Pradhan et al. (2017), el P3HB producido bajo la influencia de sustratos complejos genera una termoresistencia y cristalinidad más estable, debido a que este biopolímero puede presentar diferentes pesos moleculares, las cuales dictan las características físicas de este biomaterial. A pesar de ello, la T_m y T_c en todos los tratamientos no sufren cambios aparentes, lo cual concuerda con el reporte de Ishak et al. (2016), quienes informan que los protocolos de extracción que emplean ultrasonido de baja frecuencia (37-44 kHz) no ocasionan cambios en estas propiedades térmicas; lo cual indica estabilidad en el P3HB recuperado con el protocolo US & SFE. Cabe destacar que la baja T_m (164.01-168.05 $^{\circ}\text{C}$) obtenida en

todos los tratamientos es indicativa de mejores propiedades biodegradables (Nygaard et al. 2019). Este hallazgo denota una menor rigidez, por lo que este biopolímero puede ser moldeado y extruido para la producción de diversos productos como empaques plásticos, películas resistentes al agua y diversos contenedores (Sathya et al. 2018).

En cuanto a los estudios de cristalinidad realizados por XRD; al igual que los análisis térmicos por DSC, muestran que el P3HB producido en los medios de cultivo GRPD y M-A incrementan su cristalinidad cuando el protocolo US & SFE es empleado para su extracción. No obstante, el biopolímero producido en el medio Agavinas no presenta gran diferencia en intensidad cuando el US & SFE es empleado. Por lo que se reitera la presencia de un peso molecular distinto al producido bajo la influencia de los medios de cultivo GRPD y M-A. Por igual, los índices de cristalinidad evaluados parecen no mostrar una gran diferencia entre los medios de cultivo y los protocolos de extracción evaluados. Si bien, este índice no es tan alto (lo cual es benéfico para considerar el potencial biodegradable de este biopolímero), es reportado que no es un cálculo absoluto, por lo que solo es útil para hacer comparaciones generales (Özgören et al. 2018; Xu et al. 2002). Por otra parte, el tamaño de cristal calculado indica diferencias entre los protocolos de extracción, esto debido a que se observó que el tamaño de cristal era mayor cuando el biopolímero es recuperado con el protocolo US & SFE.

Los resultados obtenidos podrían explicarse mediante dos razones: **(1)** el efecto de cavitación descrito por Contreras-Hernández et al. (2018) e Ishak et al. (2016), el cual se basa en la ruptura de las regiones amorfas del biopolímero durante la digestión con NaOCl y la inherente propiedad de recristalización producida por los intercambios de los enlaces O-H que ocurren al suspender el extracto en cloroformo caliente (Suttiwijitpukdee et al. 2011) y **(2)** el efecto de la digestión celular en NaOCl, ya que esta reportado que una prolongada digestión celular a condiciones cálidas reduce el peso molecular del biopolímero hasta en un 30%. Lo cual influye en las propiedades térmicas y cristalinas del biomaterial extraído (Pérez-Rivero et al. 2019). Por lo tanto, el protocolo US & SFE es un método rápido que reduce la digestión con NaOCl y mejora las propiedades físicas del P3HB obtenido.

La excepción a la regla fue el biopolímero producido con el medio Agavinas, puesto que el tamaño de cristal observado es similar cuando se extrae mediante ambos

protocolos de extracción, por lo que se considera que las agavinas al emplearse como una fuente de carbono compleja permite la producción de biopolímeros tipo P3HB con mayor estabilidad física; en contraste con la obtenida bajo la influencia de carbohidratos simples.

Acerca de la morfología superficial de las biopelículas obtenidas, se observó una mayor rugosidad y porosidad cuando el US & SFE fue empleado para el proceso de extracción. De acuerdo con la información reportada por Ankita et al. (2020), los procesos de extracción que involucran ultrasonido producen películas de P3HB con mayor porosidad, lo cual permite una mejor biodegradabilidad dado que los microorganismos pueden adherirse con mayor facilidad a estos microporos. Por consiguiente, el protocolo US & SFE permite la eficiente extracción de homopolímeros de P3HB con mejores propiedades térmicas, cristalinas y morfológicas; el cual presenta características biodegradables que lo hacen adecuado para la fabricación de diversos productos plásticos. Asimismo, las agavinas como una nueva fuente de carbono compleja favorece la biosíntesis de P3HB con propiedades físicas estables que lo hacen apropiado para su uso en cuestiones médicas.

CAPÍTULO 6

IMPACTO DE LOS PARÁMETROS NUTRICIONALES SOBRE LA MORFOLOGÍA DE *Bacillus cereus* 4N DURANTE LA ACUMULACIÓN DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Resumen

Los carbonosomas de P3HB son estructuras citoplasmáticas cubiertas por proteínas hidrofóbicas de carácter estructural y catalítico. Estas inclusiones son multifuncionales; siendo sus principales funciones el almacén de energía y la protección ante agentes estresantes. La biosíntesis de estas estructuras dentro de la célula provoca cambios morfológicos los cuales están influenciados por los nutrientes. El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de distintas condiciones nutricionales sobre la morfología de *B. cereus* 4N y del carbonosoma acumulado por esta cepa bacteriana. Los resultados demuestran que la cepa bacteriana presenta diferentes tamaños y volúmenes en su estructura y el carbonosoma producido, siendo la formulación M-A aquella con la que se obtiene un mayor tamaño y número de carbonosomas. Interesantemente, las agavinas propician la biosíntesis de carbonosomas de mayor tamaño. Por ende, la morfología de *B. cereus* 4N y el carbonosoma que acumula está condicionado por la fuente de carbono empleada.

Palabras clave: agavinas • *Bacillus* • carbonosomas • microscopía confocal • polihidroxialcanoatos

1. Introducción

El P3HB se acumula a manera de gránulos citoplasmáticos denominados como carbonosomas; un término acuñado debido a la multifuncionalidad que desempeñan estas estructuras en la célula bacteriana (Jendrosseck 2009). Estas inclusiones consisten en complejos supramoleculares compuestos por un núcleo de P3HB y una capa superficial de proteínas altamente hidrofóbicas con funciones estructurales y catalíticas (Bresan et al. 2016). Asimismo, los carbonosomas representan una fracción de la célula bacteriana (< 90%) y llevan a cabo funciones protectoras (aparte de ser un almacén de energía); tales como, la resistencia celular ante temperaturas extremas, presión osmótica y oxidativa, irradiación por luz UV y la presencia de alcoholes, metales pesados o agentes desecadores. Sin embargo, estas funciones aún no han sido del todo dilucidadas (Obruca et al. 2017).

Hoy en día se conocen cuatro modelos que explican la formación de estos carbonosomas. El primero es la formación de micelas, las cuales a medida que la cantidad de biopolímero crece se incorporan a esta estructura. El segundo modelo explica que la enzima PhaC sintasa es la que incorpora a las demás proteínas que conforman esta estructura. El tercero habla de que los gránulos de P3HB se forman desde la membrana celular proponiendo que la PhaC sintasa se encuentra en los polos de la célula y el cuarto modelo explica que la presencia de andamios entre las membranas es la responsable de la formación de los carbonosomas. No obstante, ninguno de estos modelos ha sido comprobado, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios microscópicos (Laycock et al. 2013).

Lo que se sabe es que los carbonosomas de P3HB varían en número y tamaño dependiendo de las condiciones de cultivo y que al ser biosintetizados generan cambios morfológicos en la célula bacteriana (Jendrosseck y Pfeiffer 2014). Generalmente, la literatura ofrece el conocimiento de cambios estructurales que sufren cepas como *Cupriavidus necator* (Mravec et al. 2016) y *Halomonas* sp. (Park et al. 2020). Sin embargo, aún no hay publicaciones acerca de los cambios que sufren cepas del género *Bacillus* durante este proceso. Por esta razón, el objetivo del presente capítulo fue realizar un estudio mediante microscopía confocal de fluorescencia sobre los efectos que ocasionan distintos parámetros nutricionales en la estructura celular y la biosíntesis de carbonosomas de P3HB en la cepa *B. cereus* 4N.

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos y sustratos

Los productos químicos de grado analítico utilizados en el presente estudio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (E.U.A). El jarabe de agave y la harina de soya empleados como sustratos fueron obtenidos de mercados locales en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México y las agavinas fueron obtenidas de mercados locales en la ciudad de Zapopan, Jalisco, México.

2.2. Cepa bacteriana

Para el presente estudio se utilizó la cepa bacteriana *B. cereus* 4N (NCBI-GenBank: MH404097), la cual fue previamente aislada y caracterizada como productora de biopolímeros P3HB en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Esta cepa bacteriana fue registrada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas (WDC-CDBB-500, CINVESTAV, México) con el número de registro CDBB-L-2032 y preservada en una solución de esporas a -20 °C (Harrold et al. 2011).

2.3. Medios de cultivo y condiciones de fermentación

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo con los siguientes medios de cultivo:

- Control (-): Peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).
- GRPD (medio rico en glucosa y deficiente en peptona): Glucosa (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹) (Masood et al. 2017).
- M-A (medio Martínez-Alemán): Jarabe de agave (15.0 gL⁻¹), harina de soya (1.5 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).
- Medio Agavinas: agavinas (15.0 gL⁻¹), peptona (2.0 gL⁻¹), extracto de levadura (2.5 gL⁻¹) y NaCl (1.25 gL⁻¹).

Los medios de cultivo fueron ajustados a pH 6 con un potenciómetro OrionStar A214 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) y esterilizados a 120 °C, 15 lbp durante 15 min en una autoclave 25x-1 (All American, E. U. A).

Los procesos de fermentación fueron llevados a cabo partiendo de matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de la preparación a evaluar (pre-inóculo). Posteriormente, esta fue inoculada con 100 μL (10^8 UFC mL^{-1}) de la solución de esporas de *B. cereus* 4N (previamente reactivada con un choque térmico a 100 °C durante 1 min) y fue incubada con agitación continua en una incubadora MaxQ4000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 24 horas. Después matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de la misma preparación; se inocularon al 2 % (vv^{-1}) con el pre-inóculo fermentado durante 24 horas. Luego, estos matraces de fermentación se incubaron con agitación continua en una incubadora MaxQ8000 (Thermo Fisher Scientific, E. U. A) a condiciones de 30 °C, 150 rpm durante 48 horas.

2.4. Estudios por microscopia confocal de fluorescencia

2.4.1. Montaje y tinción

Se tomaron muestras de 50 μL de los medios de cultivo y se realizaron frotis fijados al calor, los cuales fueron teñidos con el colorante lipofílico azul de Nilo A al 1% (vv^{-1}) a una temperatura de 55 °C durante 10 min. Posteriormente, estas muestras fueron lavadas con ácido acético al 8% (vv^{-1}) y agua destilada (Ostle y Holt 1982). Las tinciones se secaron y fueron cubiertas con agarosa al 2% (pv^{-1}) a 35 °C y luego se cubrieron con un cubreobjetos de 20×20 μm con grueso de 150 μm .

2.4.2. Parámetros del microscopio confocal de fluorescencia

Las observaciones fueron realizadas empleando el microscopio de confocal invertido SP8 DMI8 (Leica, Alemania). Para determinar el rango óptimo de excitación y emisión se realizó un escaneo previo con los láseres UV (405 nm), FITC (488 nm), YFP (514 nm), TRITC (552 nm) y CY5 (638 nm). Obteniéndose un rango de excitación de 573 nm y emisión de 618 nm con el láser TRITC.

2.4.3. Procesamiento de imágenes y cálculos geométricos

Las imágenes obtenidas fueron procesadas en fluorescencia y fusión con parámetros de proyección máxima, resolución teórica en los ejes x y z, ganancia de 837.2 y una magnificación de 100×. Todo esto con el software Leica SP8.

Además, el volumen de la célula fue calculado con una aproximación cilíndrica y el carbonosoma de P3HB con una aproximación esférica de acuerdo con la metodología reportada por Mravec et al. (2016). Cabe destacar que los cálculos realizados fueron representados como la media de 25 células distribuidas en distintos cuadrantes. Todos estos cálculos fueron analizados con los softwares ImageJ e ImagePro.

3. Resultados

La cepa bacteriana empleada en este estudio presentó la biosíntesis de carbonosomas de P3HB a manera de fluorescencia roja en todas las condiciones nutricionales evaluadas (**Fig. 21**). Sin embargo, la formación de estas inclusiones citoplasmáticas fue distinta en cada una de las evaluaciones, mostrándose una baja formación de carbonosomas y una alta presencia de cuerpos esporales cuando *B. cereus* 4N se inoculó en el Control (-) (**Fig. 21 a**). Por otra parte, cuando la cepa bacteriana fue inoculada en los medios de cultivo GRPD y M-A se observó un incremento en el desarrollo celular y de fluorescencia (**Fig. 21 b, c**). Y, en el caso del medio de cultivo suplementado con agavinas se observó que la cepa bacteriana presenta la formación de carbonosomas con mayor tamaño.

La **Fig. 22** representa la posible estructura geométrica de *B. cereus* 4N bajo la influencia de las condiciones nutricionales evaluadas. En esta se indica la presencia de 1-3 carbonosomas distribuidos en el centro y polo de la célula. Observándose que el menor tamaño celular se obtiene bajo la influencia del Control (-). Por su parte, los medios de cultivo suplementados con carbohidratos simples (GRPD y M-A) generan una mayor presencia de carbonosomas dentro de la célula, presentando hasta 3 estructuras bajo la influencia del medio de cultivo M-A. Cabe destacar, que cuando se emplearon las agavinas como fuente de carbono la célula bacteriana redujo su tamaño, pero produjo un carbonosoma céntrico de tamaño considerable.

Los análisis geométricos serían confirmados en la **Fig. 23** donde se midieron los cambios de longitud, ancho, volumen celular y volumen de carbonosoma que sufre *B. cereus* 4N bajo la influencia de las condiciones nutricionales evaluadas. El menor tamaño, volumen celular y volumen de carbonosoma fue bajo la influencia del Control (-), en el caso de los medios de cultivo suplementados con carbohidratos simples (GRPD y M-A) se observó un alargamiento de la célula y un incremento del volumen del carbonosoma. No obstante, el medio de cultivo suplementado con agavinas como un carbohidrato complejo presentó un bajo volumen celular y el mayor tamaño de carbonosoma. Curiosamente el ancho de la célula bacteriana no presenta cambios ante la presencia de todas las condiciones nutricionales empleadas, por lo que se puede mencionar que la biosíntesis y el arreglo de estos cuerpos intracelulares es de manera vertical en *B. cereus* 4N.

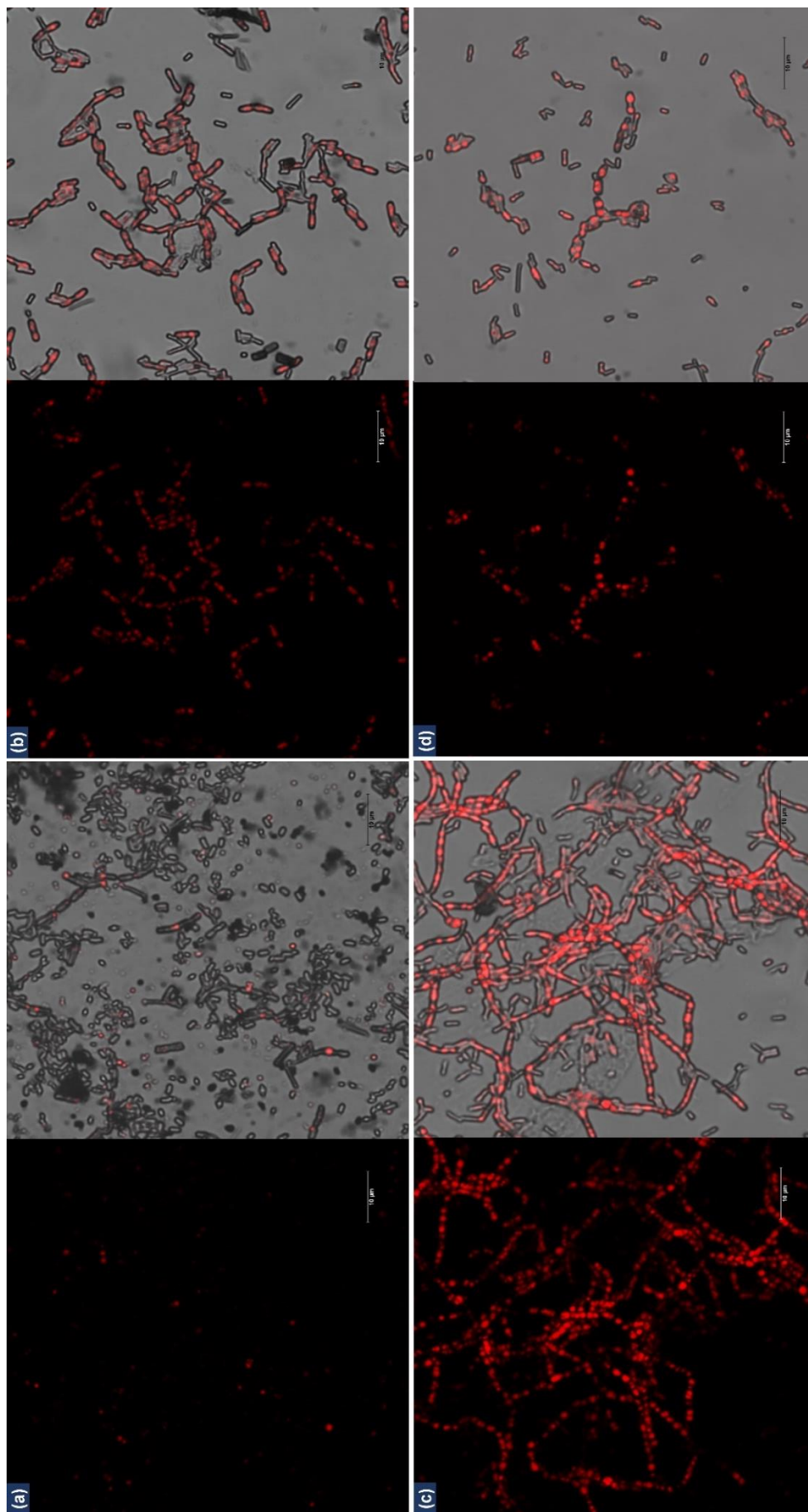


Fig. 21. Imágenes por microscopía confocal de fluorescencia. (a) *B. cereus* 4N bajo la influencia del medio basal sin fuente de carbono (Control -), (b) *B. cereus* 4N bajo la influencia del medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (GRPD), (c) biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia de la formulación diseñada en este estudio compuesta por jarabe de agave y harina de soja (M-A) y (d) biopolímero producido por *B. cereus* 4N bajo la influencia del medio basal adicionado con agavinas como fuente de carbono. Derecha: imagen de fluorescencia confocal. Izquierda: imagen de fusión. Barra 10 µm y magnificación de 100 ×

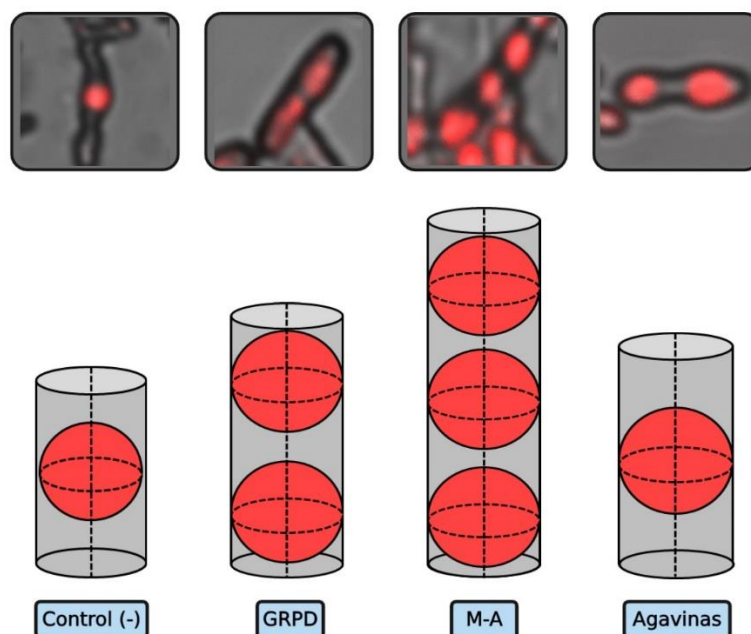


Fig. 22. Esquematización geométrica de *B. cereus* 4N y de los carbonosomas de P3HB producidos bajo la influencia de distintas condiciones nutricionales. **Control (-):** medio basal sin fuente de carbono. **GRPD:** medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona. **M-A:** medio diseñado en este estudio compuesto por jarabe de agave y harina de soya. **Medio Agavinas:** medio basal adicionado con agavinas como fuente de carbono.

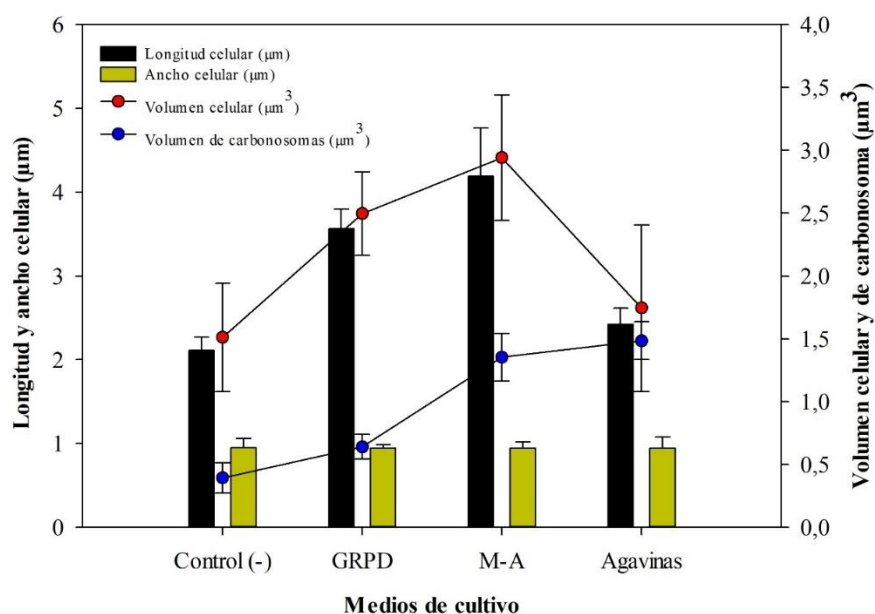


Fig. 23. Análisis de los parámetros geométricos de *B. cereus* 4N y de los carbonosomas de P3HB producidos bajo la influencia de distintas condiciones nutricionales. **Control (-):** medio basal sin fuente de carbono. **GRPD:** medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona. **M-A:** medio diseñado en este estudio compuesto por jarabe de agave y harina de soya. **Medio Agavinas:** medio basal adicionado con agavinas como fuente de carbono.

4. Discusión

La morfología celular y los cambios en ella son factores cruciales que afectan el flujo metabólico, el intercambio de nutrientes y la capacidad biosintética. Por esta razón, las bacterias controlan sus tamaños y formas para cumplir de manera eficiente los requisitos impuestos por la división celular, la adhesión a superficies, el movimiento para la búsqueda de nutrientes y la evasión de agentes inhibidores (Marshall et al. 2012; Mravec et al. 2016).

En este capítulo se determinó que la morfología celular y la formación de los carbonosomas de P3HB fueron influidos por las condiciones nutricionales evaluadas. En primer lugar, se observaron los efectos de la falta de una fuente de carbono en el Control (-); dado que esta condición ocasionó una baja estructura celular y del carbonosoma polimerizado, así como una alta formación de cuerpos esporales. De acuerdo con Borah et al. (2002), la fuente de carbono es un sustrato que determina la generación de biomasa, el almacén de P3HB y el mantenimiento energético. Sin embargo, la falta de este sustrato ocasiona una condición de inanición que obliga a *B. cereus* 4N producir esporas para su sobrevivencia; esto se debe a la transcripción de los genes *spoOA* responsables de la esporulación durante la limitación de nutrientes (Narayanan y Ramana 2012). Mientras que, en el aspecto estructural se infiere que el gasto energético provocado por el proceso de esporulación desvía la energía necesaria para el mantenimiento celular y el almacenamiento de P3HB (Mizuno et al. 2010).

En segunda instancia se analizaron los cambios morfológicos que ocurren en la cepa bacteriana cuando es inoculada en medios de cultivo adicionados con carbohidratos simples (GRPD y M-A) y complejos (Medio Agavinas). Bajo la presencia de todos estos azúcares se observó la acumulación de carbonosomas de P3HB, pero la formulación diseñada en este proyecto (M-A) fue con la que se obtuvo una mayor estructura celular e incluso un mayor número de carbonosomas acumulados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Park et al. (2020), cuyos estudios informan que *Halomonas* sp. YLGW01 presenta una mayor longitud (hasta 8.39 μm) y acumulación de P3HB cuando fue inoculada en medio MB adicionado con fructosa al 2% (vv^{-1}); incluso esta cepa bacteriana reporta una estructura mayor bajo este azúcar que cuando se inoculó bajo la influencia de glucosa como fuente de carbono. Determinándose que la preferencia sobre sustratos ricos en

fructosa influye en un mayor tamaño celular y una mayor acumulación de los carbonosomas de P3HB. Por otra parte, cabe señalar que cuando la cepa *B. cereus* 4N fue inoculada en el medio suplementado con agavinas presentó un bajo tamaño celular, pero produjo el mayor tamaño de carbonosoma. Bioquímicamente las agavinas son polisacáridos altamente ramificados compuestos por moléculas de fructosa y glucosa unidas mediante enlaces β (2-1) y β (2-6) (García-García et al. 2019). Conforme a lo reportado por Park et al. (2020), la preferencia sobre la fructosa influye en los cambios morfológicos de estas estructuras, por lo que en este caso se infiere que la presencia de este azúcar parece contribuir en un aumento del tamaño celular y del carbonosoma. No obstante, el bajo tamaño de la célula se debe a los desvíos energéticos que ocasiona el metabolizar este sustrato complejo; el cual parece ser aprovechado en mayor medida para acumular P3HB que para el desarrollo y mantenimiento de la célula bacteriana.

Otro aspecto que destacar es que la cepa en estudio a pesar de tener cambios en longitud y volumen parece no cambiar el ancho celular, lo cual indica que la acumulación de los carbonosomas es de manera vertical; es decir, la célula bacteriana se alarga cuando almacena este biopolímero bacteriano. Dichos resultados son similares a lo informado por Mravec et al. (2016), quienes reportan que *Cupriavidus necator* varía su longitud y número de carbonosomas a través del tiempo de fermentación, pero no hay cambios significativos en el ancho celular. Por lo tanto, la acumulación de carbonosomas de P3HB es influida por la naturaleza estructural de la cepa bacteriana, los sustratos usados como fuente de carbono y las condiciones de fermentación.

Es preciso informar que los resultados obtenidos en este capítulo deben ser comprobados empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis moleculares, puesto que estos cambios morfológicos pueden estar ligados a la transcripción de los genes *mreB* y *ftsZ* involucrados en la división celular y los genes *phaP* y *phaZ* implicados en la estructura y densidad del carbonosoma (Park et al. 2020). Esto con el objetivo de dilucidar los mecanismos exactos por los cuales ocurren estos cambios morfológicos.

CONCLUSIONES

Hoy en día, la búsqueda de alternativas para la eficiente producción de P3HB ha sido un reto prioritario a nivel investigación, esto debido a que el mercado mundial de los plásticos exige el uso de nuevos materiales que preserven la sustentabilidad ecológica y económica de la población y sus futuras generaciones. Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran un aumento en los rendimientos productivos de biomasa celular y P3HB cuando la cepa bacteriana *B. cereus* 4N fue inoculada bajo la influencia de la nueva formulación Martínez-Alemán (M-A) compuesta por jarabe de agave y harina de soya como sustratos de bajo costo. Asimismo, las condiciones óptimas de incubación fueron determinantes para inducir un incremento en la producción de este biopolímero bacteriano. Aunado a ello, el escalamiento a nivel biorreactor permitió un mejor desarrollo celular, lo cual influyó en mejores rendimientos productivos del P3HB. También, el protocolo de extracción US & SFE efficientizó el proceso de recuperación y mejoró las propiedades físicas de este biomaterial, dichas cualidades obtenidas lo hacen un recurso apto para su empleo en diversos rubros agrícolas, industriales y médicos. Además, los análisis por microscopía confocal determinaron cambios morfológicos en la cepa bacteriana, destacando un mejor desarrollo celular bajo la influencia de la formulación M-A.

Por lo tanto, los resultados presentados en este proyecto contribuyen a las alternativas buscadas para optimizar la producción de P3HB, donde el medio de cultivo desarrollado (aparte de beneficiar los procesos de producción), también presenta un impacto social interesante, puesto que el uso de recursos renovables de carácter regional o nacional promueve el desarrollo sustentable y económico de las comunidades dedicadas a la producción y comercialización de estos. Asimismo, la tendencia de los protocolos de extracción “verde” permiten preservar la sustentabilidad ecológica buscada para los procesos de producción de P3HB puesto que reducen el empleo de solventes orgánicos y mejoran el proceso extractivo. En consecuencia, el estudio desarrollado fomenta la producción de P3HB de manera sostenible.

PERSPECTIVAS

- ❖ Seguir aislando y evaluando nuevas cepas bacterianas cuyo metabolismo permita generar altas cantidades de P3HB bajo la influencia de distintos sustratos y condiciones de cultivo.
- ❖ Diseñar o modificar medios de cultivo a base de nuevos sustratos económicos o residuales de carácter regional y/o nacional.
- ❖ Estudiar el efecto de cultivos mixtos, sistemas alimentados (fed-batch) y el efecto de agentes estresantes (alcoholes y ácidos orgánicos) sobre la producción de biomasa celular y P3HB a nivel biorreactor.
- ❖ Realizar un análisis de costo-beneficio sobre la producción de P3HB obtenida en el presente proyecto.
- ❖ Realizar una caracterización más exhaustiva del P3HB producido en este estudio mediante las técnicas de espectroscopía de Raman, cromatografía de gases (GC) y pruebas mecánicas (dureza, elasticidad y resistencia).
- ❖ Sustituir el cloroformo por solventes no halogenados en el protocolo de extracción US & SFE propuesto en este proyecto.
- ❖ Reforzar los resultados de morfología celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y realizar análisis transcripcionales para determinar las causas de los cambios morfológicos en la célula y carbonosoma.
- ❖ En el aspecto social contribuir al desarrollo sustentable de las comunidades rurales dedicadas a la producción de los sustratos dirigidos a la obtención de productos biotecnológicos (biocombustibles y biomateriales).

BIBLIOGRAFÍA

- Abid S, Raza ZA, Hussain T. 2016. Production kinetics of polyhydroxyalkanoates by using *Pseudomonas aeruginosa* gamma ray mutant strain EBN-8 cultured on soybean oil. 3 Biotech 6(2): 1–10.
- Akaraonye E, Moreno C, Knowles JC, Keshavarz T, Roy I. 2011. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. Biotechnology Journal 7(2): 293–303.
- Al-Battashi HS, Annamalai N, Sivakumar N, Al-Bahry S, Tripathi BN, Nguyen QD, Gupta VK. 2019. Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 18(1): 183–205.
- Albuquerque PBS, Malafaia CB. 2018. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules* 107: 615–625.
- Ali I, Jamil N. 2014. Enhanced biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from potato starch by *Bacillus cereus* strain 64-ins in a laboratory-scale fermenter. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44(8): 822–833.
- Aljuraifani AA, Berekaa MM, Ghazwani AA. 2018. Perspectives of Polyhydroxyalkanoate (PHAs) Biopolymer Production Using Indigenous Bacteria: Screening and Characterization. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 12(4): 1997–2009.
- Alves MI, Macagnan KL, Rodrigues AA, De Assis DA, Torres MM, De Oliveira PD, Moreira ADS. 2017. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Industrial Biotechnology* 13(4): 192–208.
- Amelia TSM, Govindasamy S, Tamothran AM, Vigneswari S, Bhubalan K. 2019. Applications of PHA in Agriculture. In: *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Springer, Singapore, pp. 347–361.
- Ankita D, Simanta M, Prasad SD. 2020. Study on biodegradability of PHB produced through different fermentation processes using dextrose as a substrate. *Research Journal of Biotechnology* 15(4): 26–31.
- Arumugam A, Anudakshaini TS, Shruthi R, Jeyavishnu K, Harini SS, Sharad JS. 2019. Low-cost production of PHA using cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice as potential substrate: optimization and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Babruwad PR, Prabhu SU, Upadhyaya KP, Hungund BS. 2015. Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology* 6(3): 990–995.

- Belal EB, Farid MA 2016. Production of Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) by *Bacillus cereus*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 5(7): 442–460.
- Benesova P, Kucera D, Marova I, Obruca S. 2017. Chicken feather hydrolysate as inexpensive complex nitrogen source for PHA production by *Cupriavidus necator* on waste frying oils. Letters in Applied Microbiology 65(2): 182–188.
- Bernache G, Sánchez S, Garmendia AM, Dávila A, Sánchez ME. 2001. Solid waste characterization study in the Guadalajara Metropolitan Zone, Mexico. Waste Management & Research. 19(5): 413–424.
- Biglari N, Ganjali Dashti M, Abdesahian P, Orita I, Fukui T, Sudesh K. 2018. Enhancement of bioplastic polyhydroxybutyrate P(3HB) production from glucose by newly engineered strain *Cupriavidus necator* NSDG-GG using response surface methodology. 3 Biotech 8(330): 1–11.
- Borah B, Thakur PS, Nigam JN. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. Journal of Applied Microbiology 92(4): 776–783.
- Bormann EJ, Leißner M, Beer B. 1998. Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 49(1): 84–88.
- Braunegg G, Lefebvre G, Renner G, Zeiser A, Haage G. 1995. Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. Canadian Journal of Microbiology 41: 239–248.
- Bresan S, Sznajder A, Hauf W, Forchhammer K, Pfeiffer D, Jendrossek D. 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. Scientific Reports 6: 1–13.
- Carlozzi P, Di Lorenzo T, Ghanotakis DF, Touloupakis E. 2020. Effects of pH, temperature and salinity on P3HB synthesis culturing the marine *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374. Applied Microbiology and Biotechnology 104(5): 2007–2015.
- Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. Bioresource Technology 100(23): 5996–6009.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G. 2012. Green extraction of natural products: Concept and principles. International Journal of Molecular Sciences 13(7): 8615–8627.
- Contreras-Hernández M, Ochoa-Martínez L, Rutiaga-Quñones J, Rocha-Guzmán N, Lara-Cisneros T, Contreras-Esquivel J, Rutiaga-Quñones O. 2018. Effect of ultrasound pre-treatment on the physicochemical composition of *Agave durangensis* leaves and potential enzyme production. Bioresource Technology 249: 439–446.

- Das M, Grover A. 2018. Fermentation optimization and mathematical modeling of glycerol-based microbial poly(3-hydroxybutyrate) production. *Process Biochemistry* 71: 1–11.
- de Andrade CS, Nascimento VM, Cortez-Vega WR, Fakhouri FM, Silva LF, Gomez JGC, Fonseca GG. 2019. Exploiting Cheese Whey as Co-substrate for Polyhydroxyalkanoates Synthesis from *Burkholderia sacchari* and as Raw Material for the Development of Biofilms. *Waste and Biomass Valorization*, 10(6): 1609–1616.
- Divyashree MS, Rastogi NK, Shamala TR. 2009. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology* 26: 92–98.
- Evangeline S, Sridharan TB. 2019. Biosynthesis and statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 and fabrication of biopolymer films for sustained drug release. *International Journal of Biological Macromolecules* 135: 945–958.
- Galego N, Rozsa C, Sánchez R, Fung J, Vázquez A, Santo Tomás J. 2000. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing* 19(5): 485–492.
- García-García AB, Ochoa-Martínez LA, Lara-Ceniceros TE, Rutiaga-Quñones OM, Rosas-Flores W, González-Herrera SM. 2019. Changes in the microstructural, textural, thermal and sensory properties of apple leathers containing added agavins and inulin. *Food Chemistry* 301: 1–29.
- Getachew A, Woldesenbet F. 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes* 9(1): 1–9.
- Ghosh S, Gnaim R, Greiserman S, Fadeev L, Gozin M, Golberg A. 2019. Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology* 271: 166–173.
- Gómez Cardozo JR, Mora Martínez AL, Yepes Pérez M, Correa Londoño GA. 2016. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science* 2016: 1–12.
- González-García Y, Grieve J, Meza-Contreras JC, Clifton-García B, Silva-Guzman JA. 2019. Tequila Agave Bagasse Hydrolysate for the Production of Polyhydroxybutyrate by *Burkholderia sacchari*. *Bioengineering* 6(115): 1–13.
- Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN. 1994. Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering* 44(2): 256–261.

- Harrold ZR, Hertel MR, Gorman-Lewis D. 2011. Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. *Journal of Microbiological Methods* 87(3): 325–329.
- Hernández-Núñez E, Martínez-Gutierrez C, López-Cortés A, Aguirre-Macedo M, Tabasco-Novelo C, González-Díaz M, García-Maldonado J. 2019. Physico-chemical Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat. *Journal of Polymers and the Environment* 1–7.
- Ishak KA, Annur MSM, Heidelberg T, Gumel AM. 2016. Ultrasound-Assisted Rapid Extraction of Bacterial Intracellular Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) in Medium Mixture of Solvent/Marginal Non-solvent. *Arabian Journal for Science and Engineering* 41(1): 33–44.
- Jendrossek D. 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology* 191(10): 3195–3202.
- Jendrossek D, Pfeiffer D. 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* 16(8): 2357–2373.
- Junyu Z, Shishatskaya EI, Volova TG, da Silva LF, Chen GQ. 2018. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C* 86: 144–150.
- Kannan LV, Rehacek Z. 1970. Formation of poly-beta-hydroxybutyrate by *Actinomicetes*. *Indian Journal of Biochemistry*. 7: 126-129.
- Kaur G. 2015. Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29(2): 157–172.
- Keshavarz T, Roy I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* 13(3): 321–326.
- Koller M, Gasser I, Schmid F, Berg G. 2011. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engineering in Life Sciences* 11(3): 222–237.
- Koller M, Braunegg G. 2018. Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. *Bioprocess Engineering* 2(2): 89–103.
- Koller M. 2018. Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules* 23(2): 1–20.
- Kominek L, Halvorson HO. 1965. Metabolism of Poly- β -Hydroxybutyrate and Acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 90(5): 1251–1259.

- Kosseva MR, Rusbandi E. 2018. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules* 107: 762–778.
- Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, Reis MAM. 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering* 4(2): 1–43.
- Kulpreecha S, Boonruangthavorn A, Meksiriporn B, Thongchul N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(3): 240–245.
- Kumar P, Patel SKS, Lee JK, Kalia VC. 2013. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 31: 1543–1561.
- Kung SS, Chuang YC, Chen CH, Chien CC. 2007. Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. *Letters in Applied Microbiology* 44(4): 364–371.
- Laycock B, Halley P, Pratt S, Werker A, Lant P. 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* 38: 536–583.
- Li Z, Yang J, Loh XJ. 2016. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* 8(4): 1–20.
- Lin Y. 2016. Growth Kinetics of PHB-Producing Cells and Production of Polyhydroxybutyrate Using Molasses Wastewater as a Substrate in Batch Reactor. *Journal of Biological Papers* (8): 28–35.
- Ling C, Qiao GQ, Shuai BW, Olavarria K, Yin J, Xiang RJ, Chen GQ. 2018. Engineering NADH/NAD⁺ Ratio in *Halomonas bluephagenesis* for Enhanced Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA). *Metabolic Engineering* 49: 275–286.
- Liu J, Zhou J, Wang L, Ma Z, Zhao G, Ge Z, Qiao J. 2017. Improving nitrogen source utilization from defatted soybean meal for nisin production by enhancing proteolytic function of *Lactococcus lactis* F44. *Scientific Reports* 7(1): 1–13.
- Luengo JM. 2018. Bioplásticos de origen bacteriano: los polihidroxialcanoatos. *AmbioCiencias* 16: 5–24.
- Madeira JP, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Duport C. 2015. Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Frontiers in Microbiology* 6: 1–14.
- Marshall WF, Young KD, Swaffer M, Wood E, Nurse P, Kimura A, Roeder AHK. 2012. What determines cell size? *BMC Biology* 10: 1–22.

- Martínez C. 2000. Caracterización química de la melaza residual y su empleo como aditivo alimenticio. *Revista de Tecnología Pecuaria México*. 48: 54-59.
- Martínez-Herrera RE, Alemán-Huerta ME, Almaguer-Cantú V, Rosas-Flores W, Martínez-Gómez VJ, Quintero-Zapata I, Rivera G, Rutiaga-Quñones OM. 2020. Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 771–782.
- Martínez-Herrera RE, Juárez-Ibarra YN, Almaguer-Cantú V, Alemán-Huerta ME. 2020. Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N. *Mexican Journal of Biotechnology* 5(2): 51–69.
- Masood F, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. 2012. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* FA11 isolated from TNT-contaminated soil. *Annals of Microbiology* 62(4): 1377–1384.
- Masood F, Chen P, Yasin T, Hasan F, Ahmad B, Hameed A. 2013. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-12 mol % 3-hydroxyvalerate) by *Bacillus cereus* FB11: Its characterization and application as a drug carrier. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24(8): 1927–1937.
- Masood F, Yasin T, Hameed A. 2015. Polyhydroxyalkanoates – What are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* 35(4): 514–521.
- Masood F, Abdul-Salam M, Yasin T, Hameed A. 2017. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11. *3 Biotech* 7(87): 1–9.
- Mizuno K, Ohta A, Hyakutake M, Ichinomiya Y, Tsuge T. 2010. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polymer Degradation and Stability* 95(8): 1335–1339.
- Mohapatra S, Maity S, Dash HR, Das S, Pattnaik S, Rath CC, Samantaray D. 2017. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports* 12: 206–213.
- Montañez Soto JL, Venegas González J, Bernardino Nicanor A, Ramos Ramírez EG. 2011. Enzymatic production of high fructose syrup from *Agave tequilana* fructans and its physicochemical characterization. *African Journal of Biotechnology* 10(82): 19137–19143.
- Możejko-Ciesielska J, Kiewisz R. 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* 192: 271–282.

- Mozumder MSI, De Wever H, Volcke EIP, Garcia-Gonzalez L. 2014. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry* 49(3): 365–373.
- Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, Sedlacek P, Hrubanova K, Samek O, Nebesarova J. 2016. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* 363: 1–7.
- Murugan P, Han L, Gan CY, Maurer FHJ, Sudesh K. 2016. A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of Biotechnology* 239: 98–105.
- Narayanan A, Ramana KV. 2012. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. *3 Biotech* 2(4): 287–296.
- Narváez-Zapata JA, Sánchez-Teyer LF. 2009. Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3(3): 185–191.
- Nielsen C, Rahman A, Rehman AU, Walsh MK, Miller CD. 2017. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology* 10(6): 1338–1352.
- Nygaard D, Yashchuk O, Hermida ÉB. 2019. Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon* 5(3): 1–18.
- Obruca S, Sedlacek P, Koller M, Kucera D, Pernicova I. 2017. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* 36(3): 856–870.
- Ojha S, Kapoor S. 2019. Bio-Plastics: The Suitable and Sustainable Alternative to Polyethylene based Plastics. *Acta Scientific Microbiology* 2(6): 145–148.
- Oliván Cortés R. 2016. La Cuarta Revolución Industrial, un relato desde el materialismo cultural. *URBS: Revista de Estudios Urbanos y Ciencias Sociales* 6(2): 101–111.
- Oliveira FC, Dias ML, Castilho LR, Freire DMG. 2007. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 98(3): 633–638.
- Ostle AG, Holt JG. 1982. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Applied And Enviromental Microbiology* 44(1): 238–241.
- Owen HR, Wengerd D, Miller AR. 1991. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Reports* 10(11): 583–586.

- Özgören T, Pinar O, Bozdağ G, Denizci AA, Gündüz O, Çakır Hatır P, Kazan D. 2018. Assessment of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from a novel obligate alkaliphilic *Bacillus marmarensis* and generation of its composite scaffold via electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules* 119: 982–991.
- Park YL, Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, Kim HJ, Song HS, Yang YH. 2020. Fructose based hyper production of poly-3-hydroxybutyrate from *Halomonas* sp. YLGW01 and impact of carbon sources on bacteria morphologies. *International Journal of Biological Macromolecules* 154: 929–936.
- Pavan FA, Junqueira TL, Watanabe MDB, Bonomi A, Quines LK, Schmidell W, de Aragao GMF. 2019. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery. *Biochemical Engineering Journal* 146: 97–104.
- Peña C, Castillo T, García A, Millán M, Segura D. 2014. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnology* 7(4): 278–293.
- Pérez-Rivero C, López-Gómez JP, Roy I. 2019. A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments. *Biochemical Engineering Journal* 150: 1–13.
- Philip S, Sengupta S, Keshavarz T, Roy I. 2009. Effect of impeller speed and pH on the production of poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules* 10(4): 691–699.
- Pillai AB, Kumar AJ, Thulasi K, Kumarapillai H. 2017. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhattai*. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(3): 451–460.
- Pittmann T, Steinmetz H. 2017. Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants. *Bioengineering* 4(54): 1–24.
- Ponnusamy, S., Viswanathan, S., Periyasamy, A., & Rajaiah, S. (2019). Production and characterization of PHB-HV copolymer by *Bacillus thuringiensis* isolated from *Eisenia foetida*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 66(3): 340–352.
- Pradhan S, Borah A, Kumar M, Poddar M, Dikshit P, Rohidas L, Moholkar VS. 2017. Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (*P. hysterophorus*) and aquatic (*E. crassipes*) invasive weeds. *Bioresource Technology* 242: 304–310.
- Pradhan S, Dikshit PK, Moholkar VS. 2018. Production, ultrasonic extraction, and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies* 29(8): 2392–2400.

- Prados E, Maicas S. 2016. Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Universal Journal of Microbiology Research* 4(1): 23–30.
- Ramírez-Romero G, Reyes-Velazquez M, Cruz-Guerrero A. 2013. Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(3): 463–471.
- Ray S, Kalia VC. 2017. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology* 57(3): 261–269.
- Rehman SU, Jamil N, Husnain S. 2007. Screening of different contaminated environments for polyhydroxyalkanoates- producing bacterial strains. *Biologia* 62(6): 650–656.
- Sakthiselvan P, Madhumathi R. 2019. Optimization on Microbial Production of Polyhydroxybutyrate (PHB): A Review. *International Journal of Research and Analytical Reviews* 6(1): 243–251.
- Salazar-Magallon JA, Hernandez-Velazquez VM, Alvear-Garcia A, Arenas-Sosa I, Peña-Chora G. 2015. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology* 68(1): 103–109.
- Salgaonkar BB, Bragança JM. 2017. Utilization of sugarcane bagasse by *Haloquadratum walsbyi* strain e3 for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Bioengineering* 4(2): 1–18.
- Saqib AAN, Whitney PJ. 2011. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy* 35(11): 4748–4750.
- Sathya AB, Sivasubramanian V, Santhiagu A, Sebastian C, Sivashankar R. 2018. Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria. *Journal of Polymers and the Environment* 26(9): 3995–4012.
- Sen KY, Hussin MH, Baidurah S. 2019. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: 51–59.
- Seoane IT, Manfredi LB, Cyras VP. 2018. Bilayer biocomposites based on coated cellulose paperboard with films of polyhydroxybutyrate/cellulose nanocrystals. *Cellulose* 25(4): 2419–2434.
- Shameer S. 2016. Haloalkaliphilic *Bacillus* species from solar salterns: an ideal prokaryote for bioprospecting studies. *Annals of Microbiology* 66(3): 1315–1327.
- Singh AK, Srivastava JK, Chandel AK, Sharma L. 2019. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1–26.

- Sukan A, Roy I, Keshavarz T. 2015. Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydrate Polymers* 126: 47–51.
- Suttiwijitpukdee N, Sato H, Zhang J, Hashimoto T, Ozaki Y. 2011. Intermolecular interactions and crystallization behaviors of biodegradable polymer blends between poly (3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate butyrate studied by DSC, FT-IR, and WAXD. *Polymer* 52(2): 461–471.
- Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Wang JY. 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers* 6(3): 706–754.
- Tsuge T, Hyakutake M, Mizuno K. 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(15): 6231–6240.
- Tyo KEJ, Fischer CR, Simeon F, Stephanopoulos G. 2010. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metabolic Engineering* 12(3): 187–195.
- Urtuvia V, Villegas P, Fuentes S, González M, Seeger M. 2018. *Burkholderia xenovorans* LB400 possesses a functional polyhydroxyalkanoate anabolic pathway encoded by the pha genes and synthesizes poly(3-hydroxybutyrate) under nitrogen-limiting conditions. *International Microbiology* 21: 47–57.
- Valappil SP, Boccaccini AR, Bucke C, Roy I. 2006. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 91: 1–17.
- Valappil SP, Misra SK, Boccaccini AR, Keshavarz T, Bucke C, Roy I. 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology* 132(3): 251–258.
- Velázquez Ríos IO, González-García G, Mellado-Mojica E, Veloz García RA, Dzúl Cauich JG, López MG, García-Vieyra MI. 2019. Phytochemical profiles and classification of Agave syrups using ¹H-NMR and chemometrics. *Food Science and Nutrition* 7(1): 3–13.
- Wagle A, Dixit Y, Vakil B. 2017. Optimization of Bacterial Polyhydroxyalkanoate Production Using One-Factor-at-a-Time Approach. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 8(1): 339–348.
- Wei L, McDonald AG, Stark NM. 2015. Grafting of Bacterial Polyhydroxybutyrate (PHB) onto Cellulose via In Situ Reactive Extrusion with Dicumyl Peroxide. *Biomacromolecules* 16(3): 1040–1049.
- Xu J, Guo BH, Yang R, Wu Q, Chen GQ, Zhang ZM. 2002. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer* 43(25): 6893–6899.

- Yang YH, Brigham C, Willis L, Rha C, Sinskey A. 2011. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnology Letters* 33(5): 937–942.
- Yasotha K, Aroua MK, Ramachandran KB, Tan IKP. 2006. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal* 30(3): 260–268.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Raul Enrique Martínez Herrera

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS DE TIPO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO).

Campo de Estudio: Biotecnología.

Datos personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México el 28 de febrero de 1993, hijo de Raul Enrique Martínez Cruz y Francisca Herrera Carrillo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2016 mediante la presentación de Tesis: DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PHA SINTASA Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES POLIMÉRICOS EN UNA CEPA BACTERIANA AISLADA EN N.L., MÉXICO.

PRODUCTOS GENERADOS

Patente registrada.

Título de Patente: Medio de cultivo modificado que mejora la producción de un biopolímero tipo POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) en *Bacillus cereus*.

Inventores: María Elizabeth Alemán Huerta, Raul Enrique Martinez Herrera, Verónica Almaguer Cantú, Lucia Leticia Palacios Cortez, Luis Jesús Galán Wong y Ma. Guadalupe Rojas Verde.

Registro IMPI: MX/a/2018/015762.

Publicación en Gaceta IMPI: Junio de 2020.

-
- | | |
|------|--|
| [21] | Número de solicitud: MX/a/2018/015762 |
| [22] | Fecha de presentación: 14/12/2018 |
| [71] | Solicitante(s): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN [MX] |
| [72] | Inventor(es): Lucia Leticia PALACIOS CORTEZ [MX]; Luis Jesús GALÁN WONG [MX]; Ma. Guadalupe ROJAS VERDE [MX]; María Elizabeth ALEMÁN HUERTA [MX]; Raúl Enrique MARTÍNEZ HERRERA [MX]; Veronica ALMAGUER CANTU [MX] |
| [74] | Agente: LORENA NOHEMÍ GONZÁLEZ PACHECO [MX]; NUEVO LEÓN, 66455, MX |
| [51] | Clasificación CIP: C12N 1/20 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C12R 1/085 (2006.01) |
| [52] | Clasificación CPC: C12N 1/20 (2016.05) C12P 1/04 (2013.01) C12P 7/62 (2013.01)
C12R 1/085 (2013.01) Y10S 435/822 (2013.01) |
| [54] | Título: MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO QUE MEJORA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOPOLIMERO TIPO POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) EN BACILIUS CEREUS |
| [57] | Resumen: La presente invención provee un medio de cultivo rico en glucosa y deficiente de peptona modificado en parámetros nutricionales y de incubación, debido a que su composición mejora el proceso de fermentación para la producción de biopolímeros bacterianos de tipo Poli-3-hidroxibutirato, dicho medio de cultivo se compone de sustratos alternos y económicos como fuentes de carbono y de nitrógeno, los cuales permiten mantener condiciones ligeramente ácidas incrementan el crecimiento de la cepa y la generación del biopolímero. |
-

Artículos publicados.

Martínez-Herrera, RE, Alemán-Huerta, ME, Flores-Rodríguez, P, Almaguer-Cantú, V, Valencia-Vázquez, R, Rosas-Flores, W, Medrano-Roldán, H, Ochoa-Martínez, LA, Rutiaga-Quinones, OM. 2021. Utilization of *Agave durangensis* leaves by *Bacillus cereus* 4N for polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 175: 199–208.



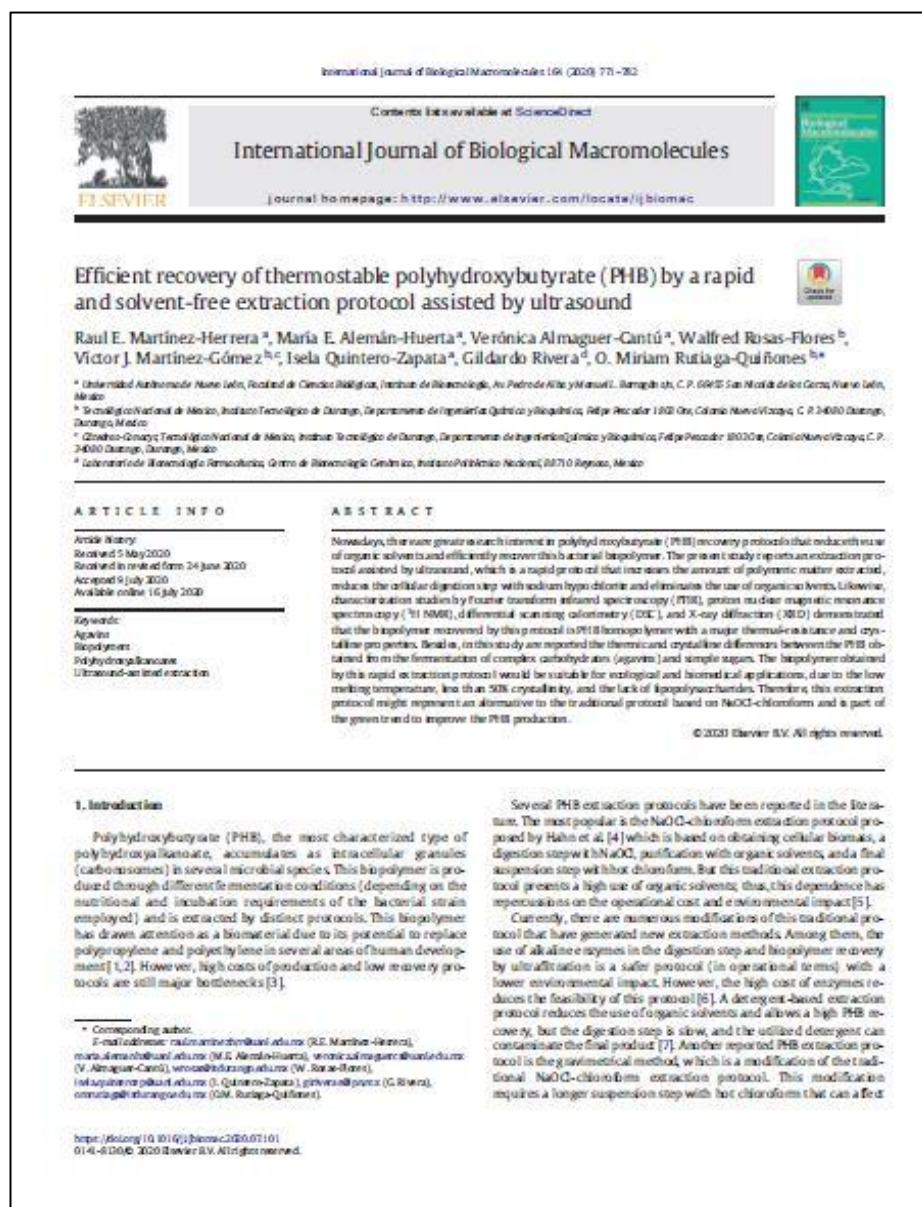
International Journal of Biological Macromolecules

ISSN: 0141-8130

Index: ELSEVIER, BioBase, PubMed, Scopus, EMBASE, INSPEC, Polymer, Content.

JCR (2020): 5.162

Martínez-Herrera RE, Alemán-Huerta ME, Almaguer-Cantú V, Rosas-Flores W, Martínez-Gómez VJ, Quintero-Zapata I, Rivera G, Rutiaga-Quñones OM. 2020. Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 771–782.



International Journal of Biological Macromolecules

ISSN: 0141-8130

Index: ELSEVIER, BioBase, PubMed, Scopus, EMBASE, INSPEC, Polymer, Content.

JCR (2020): 5.162

Martínez-Herrera RE, Juárez-Ibarra YN, Almaguer-Cantú V, Alemán-Huerta ME. 2020. Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N. Mexican Journal of Biotechnology 5(2): 51–69.



Mexican Journal of Biotechnology 2020, 5(2):51-69

ORIGINAL RESEARCH



Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N

Optimización estadística y efecto de la miel de mezquite y el líquido residual alcalino de maíz (nejayote) como sustratos para la producción de biomasa celular y la biosíntesis de polihidroxibutirato por *Bacillus cereus* 4N

Raul Enrique Martínez-Herrera, Yessica Nallely Juárez-Ibarra, Verónica Almaguer-Cantú & María Elizabeth Alemán-Huerta*

Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán. C. P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico.

*Corresponding author
E-mail address: elialeman@yahoo.com; maria.alemanhr@uanl.edu.mx (M. E. Alemán-Huerta)

Article history:
Received: 16 October 2019 / Received in revised form: 17 March 2020 / Accepted: 20 March 2020 / Published online: 1 April 2020.
<https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.51>

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a bacterial biopolymer with interesting features that make it useful in diverse areas of human development. The problem around this biomaterial is its high production cost, so researchers have focused their attention on the search of economic substrates to be used in the fermentation process. The present work is focused on designing a formulation based on mesquite honey and nejayote for cellular biomass and PHB generation by *Bacillus cereus* 4N, relying on the central compounds design and factorial design as statistical tools. The substrates employed were characterized by bromatological analysis and the biopolymer obtained from the fermentation process was analyzed by FT-IR. These results show that mesquite honey at 15 g/L influence a high cellular biomass

Martínez-Herrera et al. / Mexican Journal of Biotechnology 2020, 5(2):51-69

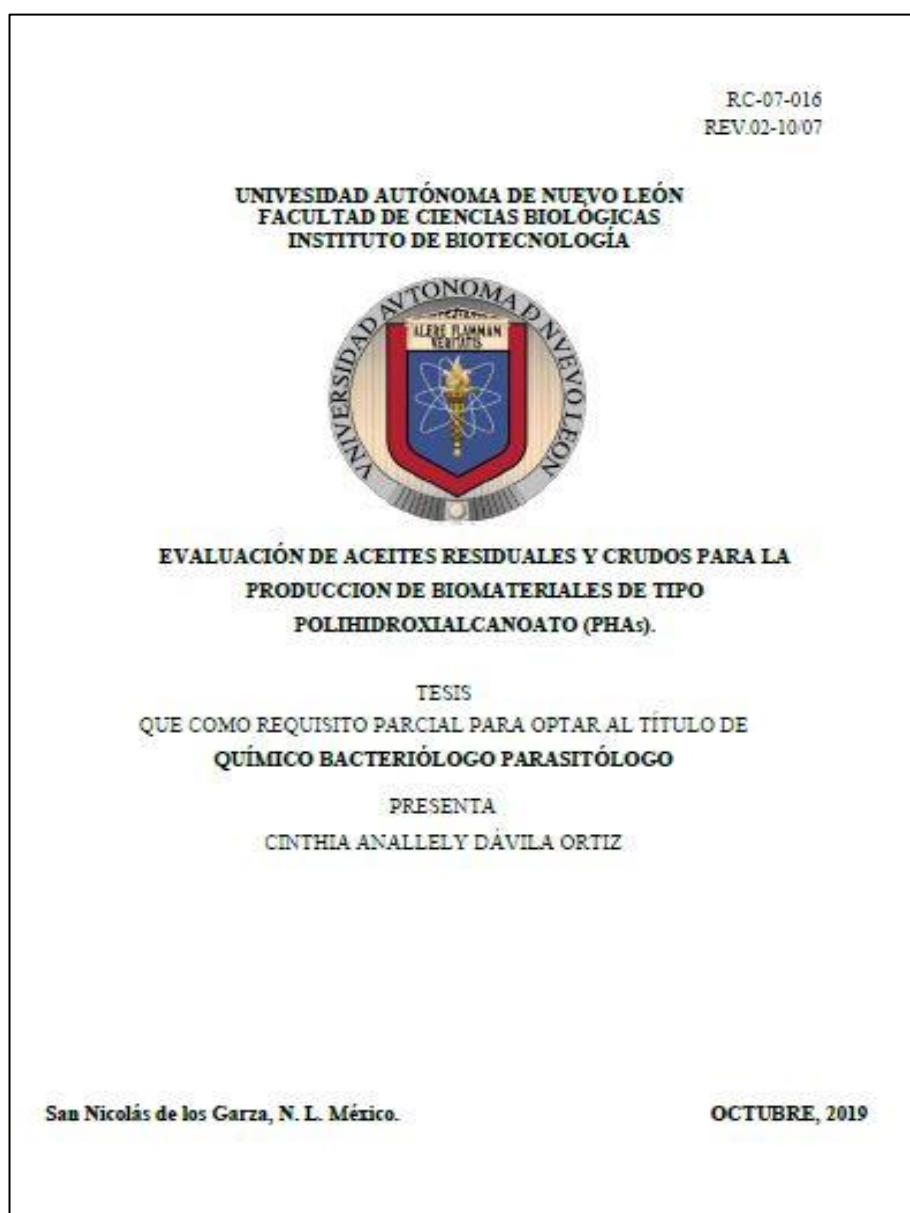
51

Mexican Journal of Biotechnology

ISSN: 2448-6590

Index: Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología (CRMCYT)-CONACyT. Scopus, LATINDEX y Periodica.

Asesoramiento de Tesis de Licenciatura.



Título: EVALUACIÓN DE ACEITES RESIDUALES Y CRUDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMATERIALES DE TIPO POLIHIDROXIALCANOATO (PHAs).

Estudiante: QBP. Cinthia Anallely Dávila Ortiz.

Asistencia y participación en congresos.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: "Aislamiento y estudio de una cepa bacteriana productora de polímeros biodegradables de tipo polihidroxicanoatos (PHAs)" en el **IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada** llevado a cabo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México en Abril de 2017.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: "Identificación molecular y bioquímica de una cepa productora de polihidroxicanoatos (PHAs) y evaluación de su producción bajo distintas fuentes de carbono" en el **IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada** llevado a cabo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México en Abril de 2017.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado "Evaluación de sustratos residuales para la producción de Poli(3-hidroxiбутирато) (P3HB) por *Bacillus sp.*" en el **XVII Congreso Internacional y XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales** llevado a cabo en la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México en Junio de 2018.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado “Selección de cepas bacterianas productoras de biomateriales” en el **XVII Congreso Internacional y XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales** llevado a cabo en la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México en Junio de 2018.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado “Evaluation of incubation parameters for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus sp.*” en el **2nd Biotechnology World Symposium y 11º Encuentro Nacional de Biotecnología** llevado a cabo en la ciudad de San José del Cabo, B. C. S., México en Octubre de 2018.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado “Optimization and kinetic study of removal of methylene blue from shrimp waste (*Litopenaeus sp.*)” en el **2nd Biotechnology World Symposium y 11º Encuentro Nacional de Biotecnología** llevado a cabo en la ciudad de San José del Cabo, B. C. S., México en Octubre de 2018.

Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Evaluación de la producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Bacillus sp.* mediante microscopía confocal” en el **VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada** llevado a cabo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México en Abril de 2019.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción y rendimiento de polímeros biodegradables por una cepa nativa del género *Bacillus*” en el **VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada** llevado a cabo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México en Abril de 2019.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Uso de aceites crudos y residuales para la producción de poli(3-hidroxibutirato) por *Bacillus sp.*” en el **XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería** llevado a cabo en la ciudad de León, Guanajuato, México en Junio de 2019.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Aislamiento de una cepa bacteriana productora de biopolímeros tipo polihidroxialcanoato en Monterrey, Nuevo León, México” en el **XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería** llevado a cabo en la ciudad de León, Guanajuato, México en Junio de 2019.



Asistencia y participación como ponente (tipo cartel) del trabajo titulado: “Aislamiento de bacterias de la larva mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) de importancia biotecnológica” en el **XXIV Congreso Nacional de Zoología** llevado a cabo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México en Noviembre de 2019.



Asistencia y participación como ponente (presentación oral) del trabajo titulado: “Caracterización de un biopolímero tipo Polihidroxialcanoato (PHA) producido por una cepa de *Bacillus cereus* bajo la influencia de un medio de cultivo rico en glucosa y deficiente en peptona (GRPD)” en el **2º Simposio de materiales, Sustentabilidad e Innovación Tecnológica (modalidad virtual)** llevado a cabo en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México en Agosto de 2020.

Asistencia y participación como ponente (presentación oral) del trabajo titulado: “Cepas bacterianas productoras de biomateriales tipo Polihidroxialcanoato (PHA) aisladas de la hemolinfa de *Hermetia illucens*” en el **2º Simposio de materiales, Sustentabilidad e Innovación Tecnológica (modalidad virtual)** llevado a cabo en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México en Agosto de 2020.




Memorias electrónicas.


Memorias electrónicas publicadas en Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina (2017). ISSN: 2448-8380.

IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada	Abril 27 y 28 2017
Identificación molecular y bioquímica de una cepa productora de Polihidroxialcanoatos (PHAs) y evaluación de su producción bajo distintas fuentes de carbono	
Enrique Martínez ^a , Carlos Saavedra ^a , Lucía Palacios ^a , Omar Tovar ^a , Guadalupe Rojas ^a y Elizabeth Alemán ^{a*} .	
^a Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.	
*maria.alemanhr@uanl.edu.mx	
Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, <i>Bacillus cereus</i> , 16S ARNr.	

IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada	Abril 27 y 28 2017
Aislamiento y estudio de una cepa bacteriana productora de polímeros biodegradables del tipo polihidroxialcanoatos (PHAs)	
Enrique Martínez ^a , Carlos Saavedra ^a , Katiushka Arévalo ^a , Verónica Almaguer ^a , Guadalupe Rojas ^a y Elizabeth Alemán ^{a*} .	
^a Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.	
*maria.alemanhr@uanl.edu.mx	
Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, <i>Bacillus</i> , PCR, FTIR, RMN.	

Memorias electrónicas publicadas en Frontera Biotecnológica (2018). ISSN: 2448-8461.

	
AM4	
EVALUATION OF INCUBATION PARAMETERS FOR POLY-3-HYDROXYBUTYRATE (P3HB) PRODUCTION BY <i>BACILLUS</i> SP.	
Enrique Martínez, Verónica Almaguer, Guadalupe Rojas, Isela Quintero, Lucía Palacios, Elizabeth Alemán. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. <u>Enrique Martínez</u> : enq2802@gmail.com	
Keywords: Biopolymers, Poly-3-hydroxybutyrate, <i>Bacillus</i> .	



AM32

OPTIMIZATION AND KINETIC STUDY OF REMOVAL OF METHYLENE BLUE FROM SHRIMP WASTE (*Litopeneus spp*)

Enrique Martínez-Herrera, Estefanía Jiménez-Manzano, Elizabeth Alemán-Huerta, Ileana Castro-González, Verónica Almaguer-Cantú
 Laboratorio 10 Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
 Cd. Universitaria, Pedro de Alba s/n CP 66450. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
 veronica.almaguerct@uanl.edu.mx
 Key words: response surface, methylene blue, optimization

Memorias electrónicas publicadas en Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina (2019). ISSN: 2448-8380.

VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada
Abril 4 y 5 2019

Evaluación de la producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Bacillus* sp. mediante Microscopía confocal

Raul E. Martínez-Herrera^a, Olga M. Rutiaga-Quinones^b, Paola Flores-Rodríguez^c y María E. Alemán-Huerta^{a*}

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

^bTecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Felipe Pescador 1803 Ote, Colonia Nueva Vizcaya, C.P. 34080. Durango, Dgo, México.

^cCentro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, (CIIDIR) IPN-Durango. Calle Sigma #119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, C.P. 34220. Durango, Dgo, México.

*maria.alemanhr@uanl.edu.mx

Palabras clave: azul de Nilo, *Bacillus*, biomateriales, confocal, polihidroxialcanoatos.

VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada
Abril 4 y 5 2019

Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción y rendimiento de polímeros biodegradables por una cepa nativa del género *Bacillus*

Carolina García Reyna^a Verónica Almaguer Cantu, Enrique Martínez Herrera, Guadalupe Rojas V, Elizabeth Aleman Huerta^{b*}

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro De Alba y Manuel L. Barragán s/n Ciudad Universitaria. C. P. 66455, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México.

*elialeman@yahoo.com.

Palabras clave: *Bacillus*, Polihidroxialcanoato, Medios modificados.

Memorias electrónicas publicadas en Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (2019). ISSN: 0188-4786.



USO DE ACEITES CRUDOS Y RESIDUALES PARA LA PRODUCCIÓN DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *BACILLUS* SP.

Cinthia A. Dávila, Raul E. Martínez, Isela Quintero, Verónica Almaguer, María E. Alemán.
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
elialeman@yahoo.com

Palabras clave: Biopolímeros, Bacillus, Polihidroxialcanoatos.



ASLAMIENTO DE UNA CEPA BACTERIANA PRODUCTORA DE BIOPOLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIALCANOATO EN MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO.

Yaresi M. González, Raul E. Martínez, Isela Quintero, Verónica Almaguer, María E. Alemán.
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
elialeman@yahoo.com

Palabras clave: Bioprospección, Polihidroxialcanoatos, VEP22.

ANEXOS

ANEXO I. Análisis estadístico realizado sobre los efectos de distintos medios de cultivo en la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB) mostrados en la **Fig. 5** (pág. 25).

ANOVA [n: 18 datos analizados]						
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p
%P3HB	Entre grupos	2746.302	5	549.260		
	Dentro de grupos	5.508	12	.459	1196.661	.000
	Total	2751.810	17			
biomasa celular (gL^{-1})	Entre grupos	30.318	5	6.064		
	Dentro de grupos	.067	12	.006	1086.027	.000
	Total	30.385	17			
P3HB (gL^{-1})	Entre grupos	4.000	5	.800		
	Dentro de grupos	.002	12	.000	5120.544	.000
	Total	4.002	17			
Tukey - %P3HB						
Medio de cultivo	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Control	3			13.41	13.41	
GRPD	3	36.13				
S-EL	3					3.62
MMM	3					4.04
RC	3	30.63	30.63			
K-R	3			17.03		
Tukey - biomasa celular (gL^{-1})						
Medio de cultivo	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Control	3				1.29	
GRPD	3	3.67				
S-EL	3		3.06			
MMM	3			2.23		
RC	3		2.87	2.87		
K-R	3	3.48	3.48			

Tukey - P3HB (gL ⁻¹)						
Medio de cultivo	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Control	3	1.35	0.88	0.59	0.17	0.09
GRPD	3					
S-EL	3				0.11	
MMM	3				0.09	
RC	3					
K-R	3					

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (medios de cultivo), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, el medio de cultivo con el que se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión es el denominado GRPD. Por lo tanto, este medio de cultivo debe ser considerado para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO II. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintos sustratos como fuente de carbono mostrados en la **Tabla 3** (pág. 32).

ANOVA [n: 30 datos analizados]								
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p		
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	35.805	10	3.581	821,896	.000		
	Dentro de grupos	.096	22	.004				
	Total	35.901	32					
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	11.547	10	1.155	2955,411	.000		
	Dentro de grupos	.009	22	.000				
	Total	11.556	32					
%P3HB	Entre grupos	7016.641	10	701.664	965,842	.000		
	Dentro de grupos	15.983	22	.726				
	Total	7032.623	32					
Tukey - %P3HB								
F. C	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)						
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
C (-)	3	56.09	36.13		23.91			
C (+)	3							
JA	3							
MC	3			28.18				
BC	3					15.36		
CP	3			24.13				
SL	3				21.08	21.08		
ARPPF	3							8.10
ARPLF	3			28.17				
ARM	3							7.95
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)								
F. C	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)						
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
C (-)	3							0.58
C (+)	3	3.67						
JA	3	3.74						
MC	3				1.42			
BC	3						1.10	
CP	3					1.32		
SL	3							0.57
ARPPF	3			2.21				
ARPLF	3		2.69					
ARM	3			2.18				

Tukey - P3HB (g \cdot L $^{-1}$)								
F. C	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)						
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
C (-)	3	2.09	1.35		0.40	0.30	0.17	0.12
C (+)	3							
JA	3							
MC	3							
BC	3							
CP	3			0.80			0.18	0.13
SL	3							
ARPPF	3							
ARPLF	3							
ARM	3						0.17	

* **C (-):** Control negativo, **C (+):** Control positivo, **JA:** Jarabe de agave, **MC:** Melaza de caña, **BC:** Bagazo de caña, **CP:** Cáscara de plátano, **SL:** Suero de leche, **ARPPF:** Aceite residual de papa frita, **ARPLF:** Aceite residual pollo frito, **ARM:** Aceite residual de motor.

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (fuentes de carbono), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, la fuente de carbono con la cual se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión es el jarabe de agave. Por lo tanto, esta fuente de carbono debe ser considerada para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO III. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintas concentraciones de jarabe de agave mostrados en la **Tabla 4** (pág. 33).

ANOVA [n: 12 datos analizados]						
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p
%P3HB	Entre grupos	2619.144	3	873.048		
	Dentro de grupos	3.996	8	.500	1747.728	.000
	Total	2623.140	11			
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	5.329	3	1.776		
	Dentro de grupos	.002	8	.000	8881.611	.000
	Total	5.331	11			
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	4.972	3	1.657		
	Dentro de grupos	.005	8	.001	2460.409	.000
	Total	4.977	11			
Tukey - %P3HB						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)		
5 gL ⁻¹	3	56.15	27.69	15.64		
10 gL ⁻¹	3		29.48			
15 gL ⁻¹	3					
20 gL ⁻¹	3					
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)		
5 gL ⁻¹	3	3.74		1.95		
10 gL ⁻¹	3		3.24			
15 gL ⁻¹	3					
20 gL ⁻¹	3		3.26			
Tukey - P3HB (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)		
5 gL ⁻¹	3	2.15		0.54		
10 gL ⁻¹	3		0.96			
15 gL ⁻¹	3					
20 gL ⁻¹	3		0.51			

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (concentraciones de jarabe de agave), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, la concentración de jarabe de agave con la cual se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión es 15 gL⁻¹. Por lo tanto, esta concentración debe ser considerada para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO IV. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintos sustratos como fuentes de nitrógeno mostrados en la **Tabla 5** (pág. 33).

ANOVA [n: 27 datos analizados]									
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p			
%P3HB	Entre grupos	21.189	10	2.119	344.118				
	Dentro de grupos	.135	22	.006					
	Total	21.325	32						
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	8.473	10	.847	623.232				
	Dentro de grupos	.030	22	.001					
	Total	8.503	32						
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	3839.440	10	383.944	135.725				
	Dentro de grupos	62.234	22	2.829					
	Total	3901.674	32						
Tukey - %P3HB									
F. N	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)							
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
C (-)	3	59.43		56.09	53.08		43.51	32.89	23.03
C (+)	3								
NS	3								
HS	3								
HM	3								
N	3								
Ch	3								
F	3								
L	3		57.68						
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)									
F. N	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)							
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
C (-)	3	4.98	4.47	3.74			2.79	2.40	
C (+)	3								
NS	3								
HS	3								
HM	3								
N	3								
Ch	3								
F	3								
L	3								

Tukey - P3HB (gL ⁻¹)									
F. N	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)							
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
C (-)	3							1.27	
C (+)	3		2.10						
NS	3								0.64
HS	3	2.25							
HM	3						1.47		
N	3			1.98					
Ch	3				1.84				
F	3					1.70			
L	3			1.90	1.90				

* C (-): Control negativo, C (+): Control positivo, NS: NH₄(SO₄)₂, HS: Harina de soya, HM: Harina de maíz, N: Nejayote, Ch: Chicharo, F: Frijoles, L: Lentejas.

➤ **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (fuentes de nitrógeno), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, la fuente de nitrógeno con la cual se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión es la harina de soya. Por lo tanto, esta fuente de nitrógeno debe ser considerada para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO V. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintas concentraciones de harina de soya mostrados en la **Tabla 6** (pág. 34).

ANOVA [n: 12 datos analizados]						
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p
%P3HB	Entre grupos	21.089	10	2.119	821,896	.000
	Dentro de grupos	.105	22	.006		
	Total	20.025	32			
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	8.483	10	.847	2955,411	.000
	Dentro de grupos	.040	22	.001		
	Total	8.513	32			
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	3839.640	10	383.944	965,842	.000
	Dentro de grupos	62.224	22	2.829		
	Total	3901.174	32			
Tukey - %P3HB						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
0.5 gL ⁻¹	3	55.40	46.41	42.51		
1.0 gL ⁻¹	3					
1.5 gL ⁻¹	3					
2.0 gL ⁻¹	3	55.17				
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
0.5 gL ⁻¹	3	5.01	3.65	3.48	3.26	
1.0 gL ⁻¹	3					
1.5 gL ⁻¹	3					
2.0 gL ⁻¹	3					
Tukey - P3HB (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
0.5 gL ⁻¹	3	2.20	2.01	1.80	1.61	
1.0 gL ⁻¹	3					
1.5 gL ⁻¹	3					
2.0 gL ⁻¹	3					

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (concentraciones de harina de soya), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, la concentración de harina de soya con la cual se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión es 1.5 gL⁻¹. Por lo tanto, esta concentración debe ser considerada para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO VI. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintos parámetros de incubación (temperatura, pH y rpm) en la producción de biomasa celular (gL^{-1}), P3HB (gL^{-1}) y porcentaje de acumulación de P3HB (%P3HB) mostrados en la **Fig. 6** (pág. 35).

Diseño factorial 3×3 [n: 54 datos analizados, r^2 : 0.94, r^2 (ajustada): 0.99]						
Elemento analizado	Variable dependiente	Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p
Modelo corregido	Biomasa celular (gL^{-1})	125.833	26	4.840	14573.217	.000
	P3HB	19.657	26	.756	3803.91	.000
	%P3HB	4311.628	26	165.832	396.934	.000
Intercepto	Biomasa celular (gL^{-1})	469.204	1	469.204	1412843.959	.000
	P3HB	43.619	1	43.619	219448.050	.000
	%P3HB	68367.142	1	68367.142	163643.304	.000
pH	Biomasa celular (gL^{-1})	1.560	2	.780	2348.413	.000
	P3HB	.287	2	.143	721.068	.000
	%P3HB	4.009	2	2.005	4.798	.012
°C	Biomasa celular (gL^{-1})	88.773	2	44.386	133654.409	.000
	P3HB	12.564	2	6.282	31606.068	.000
	%P3HB	603.627	2	301.813	722.419	.000
rpm	Biomasa celular (gL^{-1})	11.267	2	5.633	16962.762	.000
	P3HB	3.074	2	1.537	7732.739	.000
	%P3HB	975.950	2	487.975	1168.015	.000
pH * °C	Biomasa celular (gL^{-1})	8.348	4	2.087	6284.112	.000
	P3HB	1.038	4	.259	1305.351	.000
	%P3HB	730.095	4	182.524	436.888	.000
pH * rpm	Biomasa celular (gL^{-1})	3.775	4	.944	2842.125	.000
	P3HB	.115	4	.029	144.612	.000
	%P3HB	566.321	4	141.580	338.886	.000
°C * rpm	Biomasa celular (gL^{-1})	7.254	4	1.813	5460.533	.000
	P3HB	2.030	4	.508	2553.528	.000
	%P3HB	819.606	4	204.901	490.451	.000
pH * °C * rpm	Biomasa celular (gL^{-1})	4.857	8	.607	1828.175	.000
	P3HB	.549	8	.069	344.955	.000
	%P3HB	612.020	8	76.503	183.116	.000
Error	Biomasa celular (gL^{-1})	.018	54	.000		
	P3HB	.011	54	.000		
	%P3HB	22.560	54	.418		
Total	Biomasa celular (gL^{-1})	595.055	81			
	P3HB	63.286	81			
	%P3HB	72701.330	81			

Tukey - %P3HB, biomasa celular (gL ⁻¹), P3HB (gL ⁻¹)			
Parámetro de incubación	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)		
	(a)	(b)	(c)
pH	6.0	8.0	7.0
°C	30°	20°	40°
rpm	150	200	100

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (parámetros de incubación), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, los parámetros de incubación con los cuales se obtuvo un mejor crecimiento y producción del biopolímero en cuestión fueron pH 6.0, 30° C y 150 rpm. Por lo tanto, estos parámetros de incubación deben ser considerados para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO VII. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintos tiempos de incubación mostrados en la **Tabla 7** (pág. 35).

ANOVA [n: 12 datos analizados]						
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p
%P3HB	Entre grupos	1473.816	3	491.272	286.108	.000
	Dentro de grupos	13.737	8	1.717		
	Total	1487.552	11			
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	134.214	3	44.738	5336.569	.000
	Dentro de grupos	.067	8	.008		
	Total	134.281	11			
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	2.046	3	.682	359.138	.000
	Dentro de grupos	.015	8	.002		
	Total	2.061	11			
Tukey - %P3HB						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
24 h	3	40.93	35.38	22.79	12.42	
48 h	3					
72 h	3					
96 h	3					
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
24 h	3	12.19	7.27	5.20	3.07	
48 h	3					
72 h	3					
96 h	3					
Tukey - P3HB (gL ⁻¹)						
Concentración	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)				
		(a)	(b)	(c)	(d)	
24 h	3	2.24	1.66	1.52	1.09	
48 h	3					
72 h	3					
96 h	3					

- **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (tiempo de incubación), sugiriendo que estas últimas influyen en el crecimiento celular y la producción de P3HB. Asimismo, el tiempo de incubación con el cual se obtuvo un mejor crecimiento fue 96 h, mientras que la mejor producción de P3HB se observó a 48 h. Por lo tanto, un tiempo de incubación de 48 h debe ser considerado para los subsecuentes análisis experimentales.

ANEXO VIII. Análisis estadístico realizado sobre los parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel matraz mostrados en la **Tabla 8** (pág. 51).

T-Student (0.2 L) [n: 180 datos analizados]						
Parámetro cinético	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza (95%)		F	p
			Bajo	Alto		
μ (GRPD)	0.21	0.02	-0.61	0.51	18.39	.002
μ (M-A)	0.76	0.03	-0.62	0.89		
Td (GRPD)	2.45	0.25	2.03	2.83	12.18	.000
Td (M-A)	0.91	0.03	1.83	3.03		
Biomasa (GRPD)	3.77	0.04	-1.78	-1.16	11.35	.003
Biomasa (M-A)	5.28	0.15	-1.94	-1.00		
P3HB (GRPD)	1.38	0.07	-1.04	-0.78	10.45	.002
P3HB (M-A)	2.29	0.06	-1.04	-0.79		
Y x/s (GRPD)	0.22	0.02	1.83	2.00	11.01	.000
Y x/s (M-A)	0.51	0.04	1.81	1.98		
Y p/s (GRPD)	0.11	0.01	1.00	1.10	13.04	.000
Y p/s (M-A)	0.27	0.01	0.90	1.15		
Y p/x (GRPD)	0.37	0.02	-0.62	0.89	10.01	.000
Y p/x (M-A)	0.43	0.04	-0.60	0.83		
qs (GRPD)	0.07	0.01	-0.65	0.88	9.35	.002
qs (M-A)	0.03	0.01	-0.68	0.90		
qp (GRPD)	0.06	0.01	-0.60	0.83	9.89	.004
qp (M-A)	0.09	0.02	-0.55	0.80		
Qp (GRPD)	0.03	0.01	-0.59	0.80	9.01	.002
Qp (M-A)	0.05	0.01	-0.60	0.83		

T-Student (1.0 L) [n: 180 datos analizados]						
Parámetro cinético	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza (95%)		F	p
			Bajo	Alto		
μ (GRPD)	0.26	0.02	-0.60	0.50	17.39	.000
μ (M-A)	0.76	0.04	-0.60	0.87		
Td (GRPD)	2.60	0.26	2.03	2.83	12.18	.000
Td (M-A)	0.93	0.05	1.85	3.05		
Biomasa (GRPD)	3.74	0.07	-1.75	-1.13	11.35	.003
Biomasa (M-A)	5.34	0.09	-1.92	-1.00		
P3HB (GRPD)	1.36	0.04	-1.04	-0.74	10.45	.001
P3HB (M-A)	2.27	0.04	-1.01	-0.76		
Y x/s (GRPD)	0.23	0.06	1.82	2.05	11.01	.000
Y x/s (M-A)	0.55	0.04	1.82	1.99		
Y p/s (GRPD)	0.11	0.05	1.00	1.09	13.04	.000
Y p/s (M-A)	0.29	0.02	0.90	1.15		
Y p/x (GRPD)	0.36	0.12	-0.61	0.80	10.01	.000
Y p/x (M-A)	0.44	0.01	-0.60	0.83		
qs (GRPD)	0.07	0.02	-0.63	0.87	9.35	.000
qs (M-A)	0.03	0.02	-0.68	0.90		
qp (GRPD)	0.07	0.02	-0.65	0.86	9.89	.004
qp (M-A)	0.09	0.01	-0.60	0.85		
Qp (GRPD)	0.03	0.02	-0.59	0.80	9.01	.001
Qp (M-A)	0.05	0.02	-0.61	0.80		

* μ : velocidad de crecimiento, **Td**: tiempo de duplicación, **Y x/s**: rendimiento biomasa sobre sustrato, **Y p/s**: rendimiento producto sobre sustrato, **Y p/x**: rendimiento producto sobre biomasa, **qs**: velocidad de consumo de sustrato, **qp**: velocidad de generación de producto y **Qp**: productividad volumétrica de P3HB.

➤ **Interpretación.** Al haber diferencia significativa en los resultados obtenidos se demuestra que el medio de cultivo a nivel matraz presenta influencia sobre el comportamiento cinético y productivo de *B. cereus* 4N.

ANEXO IX. Análisis estadístico realizado sobre los parámetros cinéticos evaluados a partir de las curvas de crecimiento generadas a nivel biorreactor en sistema discontinuo mostrados en la **Tabla 9** (pág. 54).

T-Student (10 L) [n: 60 datos analizados]						
Parámetro cinético	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza (95%)		F	p
			Bajo	Alto		
μ (GRPD)	0.23	0.07	-0.62	0.54	17.59	.000
μ (M-A)	0.74	0.02	-0.60	0.89		
Td (GRPD)	2.97	0.10	2.00	2.88	12.10	.000
Td (M-A)	0.93	0.04	1.87	3.09		
Biomasa (GRPD)	5.19	0.16	-1.85	-0.95	11.30	.000
Biomasa (M-A)	7.20	0.03	-1.97	-1.00		
P3HB (GRPD)	2.24	0.12	-1.00	-0.70	10.41	.000
P3HB (M-A)	4.75	0.07	-1.10	-0.65		
Y x/s (GRPD)	0.28	0.01	1.80	2.00	10.05	.000
Y x/s (M-A)	0.73	0.03	1.78	2.10		
Y p/s (GRPD)	0.16	0.01	1.00	1.07	13.08	.001
Y p/s (M-A)	0.60	0.04	0.90	1.19		
Y p/x (GRPD)	0.44	0.03	-0.60	0.88	10.01	.001
Y p/x (M-A)	0.66	0.09	-0.60	0.90		
qs (GRPD)	0.06	0.01	-0.61	0.90	10.05	.001
qs (M-A)	0.03	0.01	-0.65	0.90		
qp (GRPD)	0.09	0.01	-0.60	0.88	10.02	.000
qp (M-A)	0.14	0.02	-0.60	0.89		
Qp (GRPD)	0.04	0.01	-0.65	0.85	9.69	.000
Qp (M-A)	0.10	0.02	-0.61	0.88		

* μ : velocidad de crecimiento, Td: tiempo de duplicación, Y x/s: rendimiento biomasa sobre sustrato, Y p/s: rendimiento producto sobre sustrato, Y p/x: rendimiento producto sobre biomasa, qs: velocidad de consumo de sustrato, qp: velocidad de generación de producto y Qp: productividad volumétrica de P3HB.

- **Interpretación.** Al haber diferencia significativa en los resultados obtenidos se demuestra que el medio de cultivo a nivel biorreactor presenta influencia sobre el comportamiento cinético y productivo de *B. cereus* 4N.

ANEXO X. Análisis estadístico realizado sobre el efecto de distintos medios de cultivo y protocolos de extracción mostrados en la **Tabla 14** (pág. 78).

ANOVA [n: 18 datos analizados]							
		Suma de cuadrados	df	Media cuadrática	F	p	
%P3HB	Entre grupos	22.175	5	4.435	233.993		.000
	Dentro de grupos	.227	12	.019			
	Total	22.403	17				
biomasa celular (gL ⁻¹)	Entre grupos	13.545	5	2.709	1355.376		.000
	Dentro de grupos	.024	12	.002			
	Total	13.569	17				
P3HB (gL ⁻¹)	Entre grupos	2611.053	5	522.211	170.691		.000
	Dentro de grupos	36.713	12	3.059			
	Total	2647.765	17				
Tukey - %P3HB							
Medio de cultivo + Protocolo de extracción	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
GRPD + NaOCl-Cloroformo	3				36.13		
GRPD + US & SFE	3			40.44			
M-A + NaOCl-Cloroformo	3		43.70				
M-A + US & SFE	3	56.39					
Agavinas + NaOCl-Cloroformo	3						19.30
Agavinas + US & SFE	3				25.85		
Tukey - biomasa celular (gL ⁻¹)							
Medio de cultivo + Protocolo de extracción	Repetición	Grupos de homogeneidad (<i>p</i> ≤ 0.05)					
		(a)	(b)	(c)			
GRPD + NaOCl-Cloroformo	3		3.75				

GRPD + US & SFE	3	3.76					
M-A + NaOCl- Cloroformo	3	5.31					
M-A + US & SFE	3	5.25					
Agavinas + NaOCl- Cloroformo	3				2.57		
Agavinas + US & SFE	3				2.57		
Tukey - P3HB (gL⁻¹)							
Medio de cultivo + Protocolo de extracción	Repetición	Grupos de homogeneidad ($p \leq 0.05$)					
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
GRPD + NaOCl- Cloroformo	3				1.35		
GRPD + US & SFE	3			1.52			
M-A + NaOCl- Cloroformo	3		2.32				
M-A + US & SFE	3	2.96					
Agavinas + NaOCl- Cloroformo	3						0.50
Agavinas + US & SFE	3					0.67	

* **NaOCl-Cloroformo:** protocolo de extracción tradicional basado en digestión con hipoclorito de sodio y suspensión en cloroformo y **US & SFE:** protocolo de extracción con ultrasonido y libre de solventes.

➤ **Interpretación.** Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre las variables dependientes observadas (%P3HB, biomasa celular y P3HB) bajo la influencia de las diferentes variables independientes (medio de cultivo y protocolo de extracción), sugiriendo que estas influyen en el crecimiento celular (medio de cultivo) y en la cantidad del P3HB que se obtiene (medio de cultivo y protocolo de extracción). Cabe destacar que el protocolo de extracción US & SFE permite la mayor recuperación de P3HB e influye de manera positiva sobre el %P3HB.